

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1932-1933

N° 22

**ÉTUDE DU DOSAGE
DE
L'UROBILINE URINAIRE**

Par la Méthode de TERWEN

THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le **Juillet 1933**

par

GENEVIÈVE CHRISTOPHE

Interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. HÉRISSEY, Président.
BOUGAULT, Professeur.
FLEURY, Agrégé.

LES ÉDITIONS VÉGA
43 Rue Madame 43
PARIS
1933

DOSAGE
DE
L'UROBILINE URINAIRE

Étude critique de la Méthode TERWEN

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1932-1933

N° 22

**ÉTUDE DU DOSAGE
DE
L'UROBILINE URINAIRE**

Par la Méthode de TERWEN

THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le Juillet 1933

par

GENEVIÈVE CHRISTOPHE

Interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. HÉRISSEY, Président.
BOUGAULT, Professeur.
FLEURY, Agrégé.

LES ÉDITIONS VÉGA
43 Rue Madame 43
PARIS
1933

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUERIN, *Doyen*, *, * I.
 P. LEBEAU, *Assesseur*, O. *, * I.
 P. DESPORT, *Secrétaire*, *, * I.

PROFESSEURS

MM. GUERIN, *, * I.	Botanique générale.
BEHAL, Membre de l'Institut, G.O. *, * I.	Chimie organique.
PERROT, O. *, * I.	Histoire naturelle des médicaments.
COUTIERE, O. *, * I.	Zoologie.
LEBEAU, O. *, * I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, *, * I.	Chimie analytique.
GORIS, *, * I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. *, * I.	Physique.
DAMIENS, *, * I.	Chimie minérale.
HERISSEY, O. *, * I.	Chimie biologique.
SOMMELET, *, * I.	Hydrologie et Hygiène.
LUTZ, *, * I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, * I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. *, * I.	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. *, * I.

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE, O. *, * I. et GUERBET, *, * I.

CHARGES DE COURS

MM. Marc HONNORAT, *, * I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. *, * I.	Pharmacodynamie.
DELABY, *, * I.	Minéralogie.
PICON, * I.	Chimie minérale.
BACH, * I.	Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, *, * A.
 PICON, * I.
 MASCRE, * I.
 FLEURY, * I.

MM. BACH, * I.
 BEDEL, * I.
 REGNIER, * I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, * I., <i>agrégé</i> , chargé des T. P. de 1 ^{re} année.	Chimie générale.
FLEURY, * I. et REGNIER, * I. : <i>agrégés</i> ,	chargés des travaux de Chimie analytique.
SOUEGES, * I.	Micrographie.
LEROUX, * I.	Physique.
DEVAL, *, * I.	Microbiologie.
DELABY, *, * I., PICON, * I. et MASCRE, * I. :	

agrégés, chargés des travaux de 4^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, * I.



A MES PARENTS

A MES AMIS

LIADDOOR 1895

Librairie de l'Université
de la Faculté de Médecine
de la Faculté de Pharmacie
de la Faculté de Sciences

A M. le Professeur HERISSEY

Professeur à la Faculté de Pharmacie,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,
Officier de la Légion d'honneur.

*Hommage de très respectueuse re-
connaissance.*

HERISSEY

Librairie de l'Université
de la Faculté de Médecine
de la Faculté de Pharmacie
de la Faculté de Sciences

Librairie de l'Université
de la Faculté de Médecine
de la Faculté de Pharmacie
de la Faculté de Sciences

A M. le Professeur BOUGAULT

Professeur à la Faculté de Pharmacie,
Membre de l'Académie de Médecine,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,
Chevalier de la Légion d'honneur.

Témoignage de respect et de reconnaissance.

A M. le Professeur FLEURY

Professeur agrégé à la Faculté de Pharmacie,
Pharmacien des Asiles de la Seine.

Hommage de profonde gratitude.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

On sait que la présence d'urobiline dans l'urine est extrêmement fréquente; beaucoup d'auteurs considèrent même ce corps, à l'état de traces, comme un élément normal de l'urine.

L'élimination de ce pigment ne deviendrait donc pathologique qu'à partir d'une certaine concentration. Dans ces conditions, la simple recherche qualitative de l'urobiline devient insuffisante pour satisfaire aux besoins de la clinique, et il faut envisager le problème de son dosage.

Les principales recherches effectuées dans ce but utilisèrent la fluorescence de la combinaison zincique de l'urobiline, remarquable par sa sensibilité. Telle est, par exemple, la méthode mise au point par MM. DESCOMPS, GOIFFON et BROUSSE (6), mais on sait à quelles difficultés se heurte un dosage basé sur l'appréciation quantitative d'une fluorescence; aussi, après quelques recherches préliminaires dans cette voie (1), nous nous sommes décidée à étudier une méthode colorimétrique préconisée en 1925 par A. J. L. TERWEN (13). Cet auteur propose le dosage colorimétrique de l'urobiline urinaire sous forme d'urobilinogène, après condensation de ce corps avec la para-diméthylaminobenzaldéhyde. Le même auteur décrit également une méthode de préparation de l'urobiline à partir des matières fécales.

(1) Nous voulons remercier ici M. GOIFFON, qui nous a prêté aimablement son fluorescimètre, grâce auquel nous avons pu effectuer nos premiers essais.

Nous avons donc entrepris l'étude des travaux de TERWEN, d'abord, et surtout de sa méthode de dosage dont nous avons cherché à évaluer la constance et la précision, ensuite de la préparation que nous avons essayé de réaliser. Après avoir mis au point cette technique, nous en avons fait l'application à l'étude de certaines urobilinuries pathologiques.

Avant d'aborder l'exposé de notre travail, nous tenons à exprimer toute notre respectueuse reconnaissance à M. le Professeur HÉRISSEY, qui nous a accueilli dans son laboratoire, nous a constamment manifesté sa bienveillance, et nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous remercions M. le Professeur BOUGAULT d'avoir bien voulu faire partie du jury de notre thèse, et de nous avoir toujours prodigué sa sollicitude, au cours de nos deux années d'internat, à l'Hôpital de la Charité.

Nous tenons à témoigner ici notre reconnaissance toute particulière à M. le Professeur Agrégé FLEURY. Il a guidé ce travail et ne nous a jamais ménagé ses conseils et ses encouragements. Nous devons notre initiation aux travaux de laboratoire à sa grande expérience de la recherche scientifique.

Nous adressons nos vifs remerciements à M. POIROT, assistant du cours de chimie biologique, pour le bienveillant intérêt qu'il nous a toujours témoigné au cours de ce travail et pendant notre internat à Bicêtre.

PLAN DE L'OUVRAGE

CHAPITRE PREMIER

Généralités

- 1) Quelques données chimiques sur l'urobiline.
- 2) Historique ; exposé de quelques méthodes de dosage.

CHAPITRE II

Exposé des travaux de Terwen sur l'urobiline

- 1) *Méthode de dosage* basée sur l'appréciation colorimétrique, après réduction à l'état d'urobilinogène de la réaction obtenue avec la p.-diméthylaminobenzaldéhyde.
- 2) *Préparation de l'urobiline.*

CHAPITRE III

Etude et critique du dosage de Terwen

- 1) Etude et comparaison des appareils de mesure (colorimètre, photomètre).
- 2) Examen du dosage de l'urobilinogène (non compris la réduction).
- 3) Examen du dosage total (réduction comprise).
- 4) Influence du temps d'action du mélange réducteur.
- 5) Précision de la méthode.
- 6) Remarques et conclusions.

CHAPITRE IV

Essais de préparation de l'urobiline

- 1) Anomalie rencontrée au cours de la préparation de la stercobiline.
- 2) Extraction de l'urobiline urinaire.
- 3) Stabilité des solutions aqueuses d'urobiline.

CHAPITRE V

Application du dosage à l'étude de certaines urobilinuries pathologiques.

- 1) Influence des anesthésiques.
- 2) Ictères par rétention.

CONCLUSIONS.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

CHAPITRE PREMIER

GENERALITES

1) Quelques données chimiques sur l'urobiline

1) Il nous a paru intéressant de résumer au début de ce travail les données que nous possédons, au point de vue chimique, sur l'urobiline.

On considère généralement que le terme d'urobiline ne s'applique pas à un corps parfaitement défini, mais à un pigment, ou à un groupe de pigments, dont le caractère spécifique est la fluorescence qu'ils donnent avec les sels de zinc.

L'origine de ce pigment nous est connue, les travaux de Hans FISCHER (1) sur la synthèse du mésobilirubinogène nous permettent d'établir le cycle des transformations qui mènent de la bilirubine à l'urobiline. Nous les résumerons brièvement.

La bilirubine réduite dans certaines conditions par l'hydrogène donne un autre pigment : la mésobilirubine. Si on réduit cette mésobilirubine à l'aide d'agents réducteurs plus puissants, elle se transforme alors en un nouveau composé, le mésobilirubinogène, qui donne une coloration rouge très intense avec le réactif d'EHRlich (1), et s'oxyde à l'air pour donner de l'urobiline, reconnaissable à la fluorescence que lui communiquent les sels de zinc.

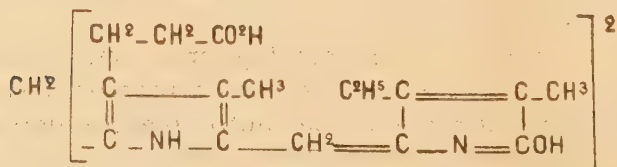
(1) Réactif d'EHRlich : mélange à parties égales d'une solution alcoolique de paradiméthylaminobenzaldéhyde à 2 p. 100 et d'acide chlorhydrique pur.

H. FISCHER a tenté d'établir la constitution de la mesobilirubine, dont la parenté avec l'urobiline est établie de la façon suivante :

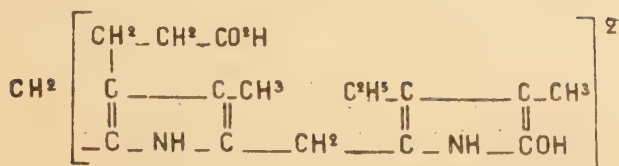
La mésobilirubine, traitée par la fusion résorcinique, donne un composé jaune, cristallisé : l'acide néoxanthobilirubique. Ce dernier est préparé par addition à la mésobilirubine de résorcine bouillante, la masse fondue est versée dans l'eau, le précipité est extrait par le chloroforme et recristallisé dans l'alcool méthylique. Cet acide néoxanthobilirubique peut être scindé en cryptopyrrol et acide hémopyrrolcarboxylique, composés qui sont tous deux connus et identifiés, et à partir desquels H. FISCHER a pu établir la synthèse de l'acide néoxanthobilirubique. D'autre part, l'acide néoxanthobilirubique peut se condenser avec les aldéhydes, c'est ainsi que deux molécules se condensent avec une molécule de formol pour donner un composé cristallisé, identique à la mésobilirubine. Tous deux, la mésobilirubine et ce composé synthétique, sont réduits par l'amalgame de sodium en un leuco-dérivé: le mésobilirubinogène. Le mésobilirubinogène ou urobilinogène donne facilement de l'urobiline par oxydation à l'air.

FISCHER attribue à la mésobilirubine et au mésobilirubinogène les formules suivantes:

Mésobilirubine:

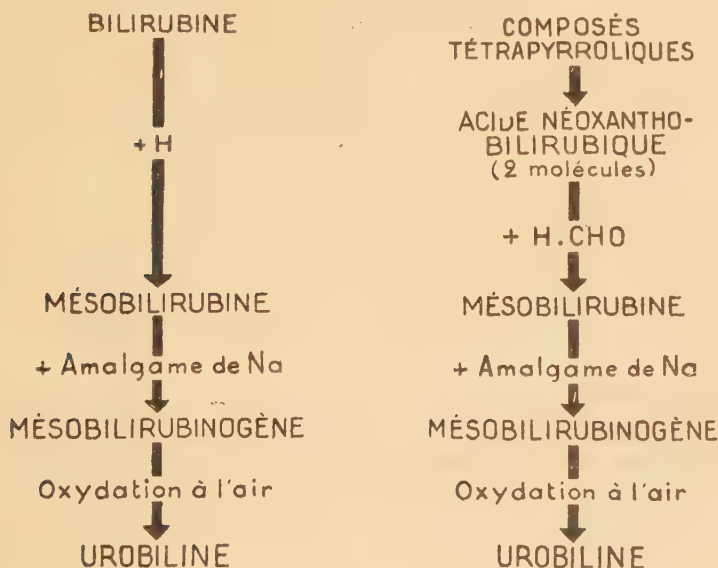


Mesobilirubinogène:



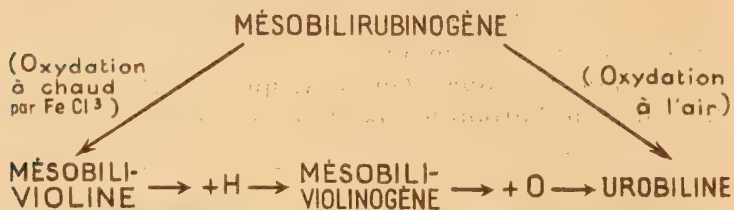
Quant à la formule de l'urobiline elle-même, elle n'a pas encore été établie.

Nous pouvons donc résumer la question de l'origine chimique de l'urobiline par l'un ou l'autre des schémas suivants :



Il faut ajouter que l'on admet généralement la possibilité d'arriver à l'urobiline par un procédé d'oxydation du mésobilirubinogène, autre que l'oxydation à l'air. En effet, le mésobilirubinogène oxydé à chaud

par le perchlorure de fer donne un pigment violet, la mésobilivioline, qui donne comme l'urobiline une fluorescence avec les sels de zinc. La réduction de la mésobilivioline mène au mésobiliviolinogène qui, s'oxydant à l'air, donne de l'urobiline. Ce qui peut se représenter de la façon suivante (DHÉRE 24) :



Même si l'on suppose identiques l'urobiline provenant directement du mésobilirubinogène et celle provenant du mésobiliviolinogène, ce qui n'est pas démontré, on peut encore se demander si l'urobiline urinaire, provenant de l'oxydation à l'air de l'urobilinogène, ne contient pas aussi un peu de mésobilirubine, pigment nettement différent de l'urobiline, puisqu'il ne donne pas la réaction de fluorescence avec les sels de zinc.

Il nous apparaît donc que la constitution de l'urobiline elle-même n'est pas bien définie. Néanmoins, d'après une communication récente de M. B. Gouzon (23), il semble qu'elle doive représenter un stade de désagrégation commune à la chlorophylle et à l'hématoporphyrine.

En effet, cet auteur a pu produire de l'urobiline par action des rayons ultra-violetés sur une solution chloroformique de l'un ou l'autre de ces pigments.

Quoi qu'il en soit, la plupart des auteurs ont établi la base de leurs différents dosages sur un produit

extrait, soit des urines, soit des matières fécales. Nous verrons, par la suite, quel procédé d'extraction permet d'obtenir un produit suffisamment purifié.

2) Exposé de quelques méthodes de dosage.

Les différentes méthodes proposées pour le dosage de l'urobiline peuvent se diviser en deux groupes, soit qu'elles dosent l'urobiline elle-même, soit qu'elles dosent l'urobiline à l'état de chromogène. Les premières sont des méthodes basées sur l'évaluation de la fluorescence donnée par les solutions d'urobiline en présence des sels de zinc, les secondes sont des méthodes colorimétriques dans lesquelles toute l'urobiline étant à l'état de chromogène, on fait apparaître la coloration rouge donnée par la paradiméthylaminobenzaldéhyde en milieu chlorhydrique.

DOSAGES PAR MESURE DE LA FLUORESCENCE

Nous exposerons seulement les deux procédés les plus récents basés sur la fluorescence, car, dans notre travail, nous ne nous sommes proposé comme but que l'étude du procédé de TERWEN et nous n'avons pas personnellement expérimenté les autres procédés.

1° *Méthode de Descomps, Goiffon et Brousse* (6)

Les auteurs, s'appuyant sur le fait que le caractère le plus spécifique de l'urobiline est la fluorescence de ce corps en présence des sels de zinc, et que cette fluorescence est variable avec la quantité de pigment, ont eu l'idée d'établir un appareil permettant de mesurer l'intensité des fluorescences de deux solutions d'urobiline zincique, dont l'une, préparée avec de l'urobiline pure Poulenc, sert de témoin. Nous ne décrirons pas cet appareil; il permet de comparer, par

une vision simultanée, les fluorescences des deux solutions, et de diluer l'une d'elles jusqu'à égalité des deux fluorescences.

Le témoin est constitué par une solution alcoolique d'urobiline additionnée d'acétate de soude, et rendue fluorescente par une solution d'acétate de zinc.

Les auteurs ayant remarqué que l'intensité de la fluorescence ne croît pas en raison directe de la concentration, ont pensé qu'il y avait intérêt à donner à la solution étalon une concentration telle qu'elle présente la fluorescence limite. C'est à cette même intensité de fluorescence que l'on amènera par dilution la solution à titrer. En opérant dans ces conditions, l'erreur maxima est, d'après les auteurs, de 1,5 p. 100.

L'urine fraîchement émise ne contient guère que de l'urobilinogène; il est donc nécessaire de l'oxyder avant de faire naître la fluorescence. Dans ce but, on traite l'urine par une solution iodo-iodurée à 5 p. 100, en présence d'amidon soluble comme indicateur; la coloration bleue doit persister entre 20 secondes et 1 minute. L'urine ainsi préparée est traitée par son volume d'alcool à 95° saturé d'acétate de zinc. On filtre. On observe la fluorescence et on dilue la solution à doser jusqu'à fluorescence égale à celle du témoin. Cette dilution se fait avec une solution normale d'acétate de soude dans l'alcool à 45°, formant solution tampon, de telle sorte que pour la fluorescence limite cherchée, on soit à un pH bien déterminé.

2° *Méthode de Royer (4)*

C'est aussi une méthode basée sur la mesure de la fluorescence. La solution témoin est constituée par une solution de trypaflavine titrée une fois pour toutes à partir d'une solution de mésobilirubinogène

(produit synthétique de H. FISCHER) oxydé par la teinture d'iode.

L'urine est oxydée par une ou deux gouttes de teinture d'iode à 3 p. 100, puis additionnée d'acétate de zinc cristallisé et d'alcool saturé d'acétate de zinc. On filtre.

On placera dans le fluorescimètre (appareil voisin de celui de DESCOMPS) une solution de dilution constituée par une solution alcoolique d'acétate de zinc et d'acétate de soude additionnée d'acide chlorhydrique.

Ce liquide possédant un pouvoir tampon assez grand permet d'opérer à un pH de 6. C'est dans cette solution que l'on versera l'urine préparée ainsi qu'il a été dit plus haut. On continuera cette addition jusqu'à fluorescence égale à celle du témoin.

DOSAGE DE L'UROBILINE SQU'S FORME D'UROBILINOGÈNE

Ces méthode de dosage ont pour base l'évaluation de l'intensité de la coloration rouge donnée avec l'urobilinogène par la p.-diméthylaminobenzaldéhyde en présence d'acide chlorhydrique. Avant d'aborder la méthode de TERWEN que nous avons particulièrement étudiée, nous examinerons quelques-unes des méthodes proposées antérieurement.

1° *Méthode de Charnas (1909) (7)*

On ajoute à l'urine du carbonate d'ammoniaque jusqu'à réaction alcaline, puis on l'abandonne un ou deux jours à l'étuve à 37°. Après ce temps, l'urobiline est à l'état d'urobilinogène. Après acidification à l'acide tartrique, on filtre rapidement et on épuise à l'éther. L'éther est lavé plusieurs fois avec de l'eau. On opère rapidement pour éviter l'oxydation du chromogène. Celui-ci est dosé dans la solution éthé-

rée, soit par spectrophotométrie, avec la réaction à la diméthylaminobenzaldéhyde, soit gravimétriquement comme il suit: la solution éthérée est placée une journée à la lumière solaire, dans un flacon contenant une petite quantité d'eau. L'urobiline qui se forme se dissout dans l'eau, la solution aqueuse est saturée par du sulfate d'ammoniaque et, après filtration, le précipité est dissous dans très peu d'alcool; la solution alcoolique est ensuite évaporée et le résidu séché et pesé.

2° Méthode de Flatow et Brünell (1913) (8)

L'urine filtrée est acidifiée avec quelques cristaux d'acide tartrique et épuisée deux fois avec cinq volumes d'éther. L'éther séparé est additionné d'une solution éthérée de p.-diméthylaminobenzaldéhyde et de quelques gouttes d'acide chlorhydrique, on agite trois minutes et on ajoute quelques cm³ d'eau, on sépare la solution colorée et on complète jusqu'à un volume connu. Cette solution est comparée au colorimètre avec une solution témoin constituée par une solution de phénolphtaléine additionnée d'un peu de carbonate de soude.

3° Méthode de Wilbur et Addis (1914) (9)

On prélève 10 cm³ des urines de vingt-quatre heures et on les additionne de 10 cm³ d'une solution alcoolique saturée d'acétate de zinc; après quelques minutes on filtre, et à 10 cm³ du filtrat on ajoute 1 cm³ de réactif d'EHRlich (Diméthylamino-benzaldéhyde: 20 g. — HCl concentré: 150 cm³. — Eau: 150 cm³). Le développement de la bande de l'urobilinogène n'étant pas instantané, il est préférable d'attendre un peu avant de faire la lecture. On emploie un spectroscope à main; on dilue avec de l'eau jusqu'à ce que les

bandes d'absorption soient disparues. On peut doser ainsi simultanément le pigment et le chromogène. Des dilutions subies par le liquide on déduit la concentration en pigment de l'urine.

4° *Méthode de Wallace et Diamond* (1925) (10)

On fait des séries de dilutions en ajoutant 1 cm³ d'urine à 20, 30, 40, 100 cm³ d'eau, etc. 10 ou 15 cm³ de chaque dilution sont placés dans des tubes et chacun additionné de 1 cm³ de réactif d'EHRlich. On attend cinq minutes. La plus grande dilution donnant une coloration rose encore visible sert à exprimer la concentration en urobilinogène, soit 1/10, 1/50, etc. Il faut opérer de préférence à la lumière du jour.

5° *Méthode de Adler* (1927) (11-12)

30 cm³ d'urine sont mélangés, à l'obscurité, avec 70 cm³ d'alcool à 50° contenant 10 p. 100 d'éther de pétrole, 1 p. 100 d'acide acétique et 0,2 p. 100 de sulfate de manganèse. Ce mélange est traité dans un appareil spécial d'extraction continue au chloroforme. Ce traitement dure six heures consécutives. Après ce temps, on dose colorimétriquement de la façon suivante: 2 cm³ d'extractum chloroformique sont additionnés de 1 cm³ de réactif d'EHRlich et de 2 cm³ d'alcool. On abandonne une demi-heure et on dose colorimétriquement. Pour ce dosage, l'auteur se sert d'un colorimètre spécial (12) fonctionnant à la manière d'un photomètre sans solution étalon.



N'ayant pas expérimenté nous-même ces méthodes, nous ne pouvons en faire la critique, mais nous remarquerons cependant que toutes, sauf celle de CHARNAS, ne dosent que l'urobilinogène préformé. Il

est certain que les urines fraîchement émises ne contiennent guère que du chromogène, mais l'oxydation rapide de celui-ci à la lumière risque de rendre tout dosage ultérieur inexact.

De plus, DESCOMPS, GOIFFON et BROUSSE, qui ont expérimenté la réduction proposée par CHARNAS, ont constaté que le séjour à l'étuve détruisait une partie du pigment.

CHAPITRE II

EXPOSE DES TRAVAUX DE TERWEN SUR L'UROBILINE

Au début de cette étude, nous allons résumer les travaux de TERWEN sur l'urobiline, et principalement la technique du dosage, puisque cette technique est la base de notre travail.

I. — Dosage de l'urobiline

La technique du dosage comporte quatre phases:

1°) *Réduction* de l'urobiline préformée à l'état de chromogène par l'hydrate ferreux;

2°) *Epuisement* de la liqueur réduite par un solvant du chromogène;

3°) *Traitement* de l'extractum par la para-diméthylaminobenzaldéhyde et l'acide chlorhydrique, ce qui provoque une coloration rouge caractéristique;

4° *Comparaison* au colorimètre de la coloration obtenue avec une solution colorée témoin.

RÉACTIFS

1°) Solution alcoolique saturée d'acide salicylique;

2°) Solution de sel de Mohr (SO^4Fe , $\text{SO}^4 (\text{NH}^4)^2$, $6\text{H}^2\text{O}$) à 16 p. 100 récemment préparée;

3°) Lessive de soude à 12 p. 100;

4°) Ether purifié (par agitation avec de la soude à 30 p. 100 et lavages à l'eau : élimination des peroxydes);

5°) Solution d'acide tartrique à 20 p. 100;

6°) Solution étherée saturée à froid de para-diméthylaminobenzaldéhyde;

7° Acide chlorhydrique à 38 p. 100;

8°) Solution saturée à froid d'acétate de soude;

9°) Solution alcoolique de phénolphtaléine (MERCK) à 0,05 p. 100;

10°) Solution saturée à froid de carbonate de soude (CO_3Na^2 sec 19 p. 100).

Ces données sont celles que fournit TERWEN; voici comment nous les avons interprétées, et le mode de préparation que nous avons employé pour ces réactifs:

Réactif I. — *Solution d'acide salicylique*. Nous avons saturé à froid de l'alcool à 90° par de l'acide salicylique. Celui-ci est soluble dans trois fois son poids d'alcool.

Réactif II. — *Solution de sel de Mohr*. Solution aqueuse contenant 16 g. de sel de Mohr pour 100 cm³ de solution.

Réactif III. — *Lessive de soude à 12 p. 100*. Nous avons dilué la lessive de soude pure contenant 40 g. de soude pour 100 cm³ de solution, c'est-à-dire que nous avons prélevé 30 cm³ de cette lessive de soude et que nous les avons amenés à 100 cm³ par addition d'eau.

Réactif IV. — *Ether purifié*. L'éther (éther rectifié du commerce $d = 0,724$) est agité avec 3 p. 100, en volume, de soude à 30 p. 100. Cette soude est obtenue par un procédé de dilution analogue à celui indiqué plus haut. Après séparation de la soude, on lave l'éther à l'eau distillée jusqu'à ce que celle-ci ne soit plus alcaline au tournesol.

Réactif V. — *Solution d'acide tartrique*. Solution

aqueuse contenant 20 g. d'acide tartrique pour 100 cm³.

Réactif VI. — Solution étherée saturée à froid de *para*-diméthylaminobenzaldéhyde.

Réactif VII. — *Acide chlorhydrique* à 38 p. 100. Nous avons utilisé la solution officinale d'acide chlorhydrique à 394 g. p. 1.000.

Réactif VIII. — *Solution d'acétate de soude*. Solution aqueuse saturée à froid; une partie d'acétate de soude se dissout dans trois parties d'eau à 15 p. 100.

Réactif IX. — *Solution de phénolphtaléine*. Nous avons employé l'alcool à 90°, 100 cm³ de solution contenant 0 g. 05 de phénolphtaléine.

Réactif X. — *Solution de carbonate de soude saturée à froid*. 100 cm³ de solution contiennent 19 g. de carbonate de soude sec.

TECHNIQUE

L'urine des vingt-quatre heures est recueillie dans un flacon brun et additionnée, quel qu'en soit le volume, de 10 cm³ de la solution d'acide salicylique (Réact. I) pour la conservation.

1°) Réduction:

L'urine est agitée (le dépôt contenant de l'urobiline). On mélange:

Urine agitée	80 cm ³
Solution de sel de Mohr (Réact. II)	20 cm ³

puis avec une pipette effilée et en agitant:

Soude à 12 p. 100 (Réac. III)....	20 cm ³
-----------------------------------	--------------------

Il se produit un précipité vert d'hydrate ferreux. On conserve dans un flacon bien bouché et complé-

tement rempli, et on laisse à l'obscurité vingt-quatre heures.

Dans certaines urines très riches, il faut doubler les doses pour avoir une réduction complète.

La liqueur surnageant le précipité ne donne plus la réaction de Schlesinger après neutralisation à l'acide acétique, et ne montre aucune bande d'absorption.

Le précipité ne retenant pas d'urobilinogène, on peut filtrer. La suite du dosage devra s'effectuer rapidement et à l'abri d'une lumière trop vive. Toutes ces précautions ayant pour but d'éviter la facile réoxydation du chromogène.

2°) *Extraction:*

On mesure dans une ampoule à décantation:

Filtrat.	20 cm ³
Solution d'ac. tartrique (Réact. V).	5 cm ³
Ether purifié (Réact. IV)	40 cm ³

On agite (60 renversements).

On sépare ensuite le liquide aqueux, et on lave en agitant quatre fois avec 3 cm³ d'eau chaque fois (1).

3°) *Réaction colorée:*

Solution étherée	30 cm ³
Solution de l'aldéhyde (Réact. VI).	3 cm ³
HCl (Réact. VII)	X gouttes

On agite fortement une minute et demie, la matière colorante se rassemble dans l'acide chlorhydrique, on

(1) Pour l'épuisement on renverse 60 fois l'ampoule à la vitesse approximative d'un renversement par seconde. Dans une urine non albumineuse, un repos d'une minute ou deux est suffisant pour amener la séparation de la couche sous-jacente.

ajoute quelques cm^3 d'eau (3 ou 4 cm^3), puis on agite, et on ajoute encore:

Solution d'acétate de soude (Réact. VIII)	3 cm^3
--	-----------------

On agite, puis on laisse reposer. La solution rouge sous-jacente est soutirée dans une éprouvette, puis l'éther est lavé avec de l'eau que l'on joint à la solution principale. On complète à 25 cm^3 . Dans certaines urines très riches, il reste dans l'éther de l'urobilinogène qui n'a pas réagi; dans ce cas, on ajoute de nouveau à l'éther ayant déjà subi le traitement V gouttes d'acide chlorhydrique, on agite une minute et demie, on ajoute de l'eau et 1 cm^3 5 d'acétate de soude. La solution colorée obtenue est ajoutée à la solution principale.

L'addition d'acétate de soude a pour but d'éliminer l'acide chlorhydrique qui a tendance à transformer l'urobilinogène en urobiline.

4° Dosage au colorimètre:

La solution témoin est constituée par de la phtaléine en milieu alcalin dans les proportions suivantes:

Solution saturée de carbonate de soude (Réact. X)	5 cm^3
Eau.	94 cm^3
Solution de phtaléine à 0,05 p. 100 (Réact. IX)	1 cm^3

La couleur de la solution à doser doit avoir une intensité plus faible que celle de la phtaléine standard.

Si la quantité d'urobilinogène contenue dans l'urine est faible, on réduira le volume de la solution finale à 5 cm^3 et, dans ce cas, on n'emploiera que V gouttes d'acide chlorhydrique et 1 cm^3 5 d'acétate de soude. La couleur finale pourra alors présenter un trouble

dû à l'aldéhyde, on y remédiera en agitant la solution colorée avec un peu d'éther frais.

La concentration en urobilinogène du mélange final est considérée comme équivalent à une unité⁽²⁾ lorsque la couleur de celui-ci est identique à celle du témoin. En prenant les quantités de réactif indiquées, et avec un volume final de 25 cm³, si l'on tient compte des dilutions successives subies par l'urine, c'est-à-dire des volumes de réactifs ajoutés et des volumes prélevés pour continuer le dosage, on aura à multiplier le résultat par :

$$1,5 \times 2 \times \frac{25}{30} = 2,5$$

Dans le cas où le volume de la liqueur finale, au lieu de 25 cm³, est de 10 cm³, la concentration en chromogène se trouve être la même que dans l'urine.

REMARQUES

Après l'exposé de sa technique, TERWEN a précisé certains points par les remarques suivantes :

1° Il est important de respecter l'ordre des réactifs : si on emploie d'abord la soude, et ensuite le sel ferreux, la réduction ne se fera pas.

2° Il faut observer rigoureusement toutes les précautions nécessaires pour éviter l'oxydation du chromogène pendant le dosage. C'est dans ce but que l'on doit :

a) — employer de l'éther purifié (peroxydes);

b) — laver l'extractum éthéré pour éliminer les substances oxydantes pouvant se trouver dans l'urine;

(2) Ce qui, comme nous le verrons plus loin, correspond à 4/10 de mg. d'urobiline pour 100 cm³.

- c) — éviter un éclairage violent;
- d) — opérer le dosage rapidement;
- e) — ne pas laisser agir trop longtemps l'acide chlorhydrique concentré.

Malgré toutes ces précautions, il arrive que l'on ne puisse éviter l'oxydation. Dans ces cas, qui sont d'ailleurs exceptionnels, on fera l'épuisement à l'éther de pétrole. Il suffira d'ajouter cet éther de pétrole de son volume d'éther sulfurique avant de faire la réaction.

DÉTERMINATION DE LA VALEUR DES UNITÉS

Il était nécessaire, pour l'étalonnage de la solution alcaline de phénolphthaléine, d'obtenir une urobiline suffisamment pure.

Voici comment TERWEN décrit cette opération:

Il part d'une urine très riche en pigment. Cette urine est réduite par la méthode habituelle. Le filtrat après réduction est acidulé à l'acide tartrique et épuisé par le double de son volume d'éther de pétrole. L'extractum est lavé à l'eau et séché à l'obscurité sur du chlorure de calcium. Après filtration, il opère un dosage sur un volume déterminé de cet extractum, en ayant soin de l'ajouter d'éther pur (l'aldéhyde est insoluble dans l'éther de pétrole). *Ce dosage donne 4 unités* ⁽³⁾ :

On concentre par distillation à l'obscurité 3.650 cm³ de l'extractum jusqu'à 500 cm³. Ce résidu est exposé pendant trois semaines à la lumière diffuse, en ayant

(3) Nous interprétons ceci de la façon suivante : la solution colorée finale doit être amenée à un volume égal à celui de l'éther prélevé pour le dosage, de sorte que le volume d'extractum sur lequel on opère n'intervient pas dans le résultat.

soin d'agiter tous les jours pour mélanger de l'air au liquide.

Une poudre orangée se dépose peu à peu; quand l'éther ne donne plus la réaction d'EHRlich, l'urobiline déposée est recueillie avec soin, lavée à l'éther de pétrole et séchée.

Il a obtenu ainsi 0 g. 0593 d'urobiline. Donc pour 3.650 cm^3 avec une concentration de quatre unités, on obtient 0 g. 0593 d'urobiline; cela signifie qu'une concentration d'une unité représente, selon cette méthode, 0 mg. 4 d'urobiline pour 100 cm^3 .

En dehors de cette préparation destinée à l'étalonnage de sa méthode, TERWEN a utilisé pour la plupart de ses essais de l'urobiline préparée à partir des matières fécales. Nous allons donc exposer tout d'abord sa méthode de préparation.

II. — Préparation de l'urobiline à partir des matières fécales par la méthode de Terwen.

100 g. de matières fécales sont triturées avec de l'eau et étendues à 500 cm^3 .

On traite par:

Solution de sel de Mohr à 16 p. 100

(Réact. II) 500 cm^3

Soude à 12 p. 100 (Réact. III) 500 cm^3

On laisse à l'obscurité vingt-quatre heures dans un flacon exactement rempli. On agite souvent.

Les traitements suivants se font avec le minimum de lumière possible. On filtre; sur une partie du filtrat, on titre l'alcalinité et, à la masse totale filtrée, on ajoute de l'acide chlorhydrique à 25 p. 100 ⁽⁴⁾,

(4) Acide chlorhydrique officinal.. 1 volume
Eau distillée 3 volumes

jusqu'à ce que la réaction ne soit plus que légèrement alcaline. La solution est placée dans une ampoule à décantation avec deux fois son volume d'éther de pétrole. On acidifie alors fortement avec la solution d'acide tartrique à 20 p. 100 (Réact. V). On agite. Après séparation, on agite de nouveau la partie aqueuse avec deux fois son volume d'éther de pétrole. Les extracta d'éther de pétrole réunis sont lavés trois fois avec de petites portions d'eau distillée, puis deséchés sur du chlorure de calcium.

On filtre et on concentre par distillation jusqu'à 750 cm³. On a soin d'éviter l'action de la lumière en recouvrant l'appareil d'un tissu opaque. Le résidu de cette distillation est traité à l'obscurité.

1°) Deux fois par 25 cm³ de soude N/10, l'urobilinogène passe dans la soude;

2°) Cette solution est agitée deux fois avec de l'éther de pétrole (purification);

3°) Enfin, la solution étant acidifiée à l'acide tartrique, on l'agite à nouveau avec de l'éther de pétrole qui, en milieu acide, s'empare de l'urobilinogène;

4° Cette solution éthérée est lavée à l'eau, séchée sur du chlorure de calcium et filtrée.

Cette solution incolore, claire, est alors exposée à la lumière diffuse.

On l'abandonne jusqu'à ce que l'urobiline de couleur orangée se dépose et que la solution surnageante ne donne plus la réaction d'EHRlich. La poudre est recueillie, l'urobiline est conservée dans un flacon en verre brun dans un dessiccateur.

L'urobiline ainsi obtenue se présente sous l'aspect d'une poudre orangée, amorphe, très peu soluble dans l'eau, mais soluble dans les alcalis dilués. En milieu acide, elle est précipitée de ses solutions par le sulfate d'ammoniaque à saturation.

Elle est facilement soluble dans le chloroforme, l'acétone, la pyridine, l'alcool, difficilement soluble dans l'éther, et insoluble dans l'éther de pétrole, le tétrachlorure de carbone, le sulfure de carbone, l'huile de paraffine. Même sans sels de zinc, ses solutions diluées dans l'alcool éthylique, l'acétone ou l'éther acétique sont fluorescentes.

Les solutions chloroformiques d'urobiline, en présence d'un sel de zinc, montrent un spectre d'absorption caractérisé par une bande unique située entre E et F, très près de F.

L'auteur ayant fait l'analyse élémentaire de l'urobiline qu'il a obtenue, a trouvé une composition centésimale permettant de lui attribuer la formule $(C^8H^{12}NO^2)^n$.

III. — Recherches de Terwen sur les diverses phases du dosage de l'urobiline dans l'urine

L'auteur examine toutes les phases du dosage pour établir qu'il n'y a pas de perte d'urobilinogène au cours des diverses manipulations:

1°) *Le dépôt d'hydrate ferreux ne retient pas l'urobiline.*

Une urine réduite est divisée en deux parties égales; sur l'une on fait un dosage après filtration, on obtient une concentration de 11 mg. 8.

La deuxième moitié, non filtrée, est additionnée d'acide tartrique qui dissout le précipité; un dosage fait dans cette solution donne 11 unités 7.

Le dépôt n'absorbe donc rien.

2°) *Une seule extraction à l'éther suffit pour extraire tout l'urobilinogène.*

Si on essaie de faire une deuxième extraction, on

s'aperçoit que l'éther n'enlève que très peu d'urobilinogène non extrait (3,7 p. 100). Une seule extraction suffit pour les besoins cliniques.

3°) *Les lavages à l'eau de l'extractum éthéré n'enlèvent pas d'urobilinogène.*

En pratiquant sur les eaux de lavages un dosage à la manière habituelle, on a trouvé des quantités d'urobilinogène de l'ordre de 1 p. 100. Donc, pratiquement, les lavages n'entraînent pas d'urobilinogène.

4°) *L'acide salicylique peut être employé sans inconvénient pour conserver l'urine.*

Deux dosages effectués sur deux portions de la même urine, l'une contenant de l'acide salicylique et l'autre n'en contenant pas, ont donné :

Avec acide: 3 unités 65;

Sans acide: 3 unités 55.

5°) *La réduction de l'urobiline en urobilinogène est-elle quantitative?*

Ces différents points du dosage étant examinés, il est bien établi que l'urobilinogène est complètement entraîné jusqu'à la réaction finale, mais il reste à démontrer que la réduction de l'urobiline est quantitative.

Pour cette démonstration, TERWEN a effectué ses essais non plus sur de l'urine, mais à partir de l'urobiline elle-même.

Divers essais ont montré à l'auteur que l'urobiline la plus pure est celle qu'il a obtenue sans l'aide de la lumière, en laissant simplement l'extractum d'éther de pétrole à l'obscurité (dans ce cas, le précipité n'apparaît que très lentement : après plus d'une année).

5 mg. de cette urobiline sont mis en solution dans

3 cm³ d'alcool, et additionnés de 50 cm³ d'eau. Cette solution est versée dans un mélange constitué par :

Solution de sel de Mohr (Réact. II).	20 cm ³
Soude à 12 p. 100 (Réact. III) ..	20 cm ³

Le tout est complété à 100 cm³, recouvert d'huile de vaseline et bien bouché. Après deux heures, le précipité est déposé et le liquide surnageant ne donne plus de bande au spectroscopie. 5 cm³ de ce liquide sont acidifiés à l'acide tartrique et agités deux fois avec 20 cm³ d'éther de pétrole. Après séparation, cet éther de pétrole est additionné de son volume d'éther sulfurique purifié et on opère le dosage à la manière habituelle. La solution colorée finale étant étendue à 100 cm³, le dosage au colorimètre donne 0 unité 56 d'urobiline.

La concentration dans le liquide après réduction était donc de $20 \times 0,56 = 11$ unités 2, c'est-à-dire de 4 mg. 48 d'urobiline dans 100 cm³.

On retrouve par conséquent $\frac{4,48 \times 100}{5} = 89,6$ p. 100 d'urobiline.

Une même expérience, faite avec une urobiline préparée à la lumière, n'a donné qu'un rendement de 48,8 p. 100.

Il résulte de ce texte que TERWEN considère implicitement l'urobiline préparée à partir de l'urine (préparation décrite page 29) comme une urobiline étalon, et que toutes les urobilines préparées à partir des matières fécales (stercobiline) lui donnent des titres inférieurs, bien qu'il ne semble pas avoir pris de précautions très spéciales pour la préparation de son urobiline urinaire.

L'auteur conclut en insistant sur trois points:

1°) Une unité représente 0 mg. 4 d'urobiline pour 100 cm³ (voir notre remarque, page 29).

2°) L'urobiline très pure, préparée par précipitation à l'obscurité, est un produit qui peut être réduit, et cela avec un rendement presque quantitatif.

3°) La technique donnée pour ce dosage permet un rendement approximatif de 100 p. 100.

Enfin, l'auteur fait remarquer toutefois qu'on ne peut affirmer l'identité de l'urobiline urinaire et de l'urobiline fécale sur laquelle il a opéré.

CHAPITRE III

ETUDE ET CRITIQUE DU DOSAGE DE TERWEN

Les essais faits par TERWEN peuvent se diviser en deux groupes :

1°) *Essais à partir de l'urine*, ayant pour but de montrer que tout l'urobilinogène formé pendant la réduction est entraîné jusqu'à la réaction colorée terme du dosage et qu'il n'y a pas de pertes appréciables du chromogène au cours des manipulations ;

2°) *Essais à partir de l'urobiline extraite des matières fécales*, destinés à prouver que celle-ci, traitée par le mélange réducteur, est intégralement transformée en urobilinogène.

Nous avons essayé de compléter ces expériences, et cela principalement en étudiant la valeur du procédé de réduction, non pas sur de la stercobiline, mais dans l'urine même, puisque, comme le pense TERWEN lui-même, il n'est pas absolument légitime de généraliser à l'urine des résultats obtenus sur une solution aqueuse de stercobiline. En effet, C. J. WATSON, dans un mémoire récent (15), signale la non-identité de la stercobiline et de l'urobiline ; par réduction, la stercobiline donne naissance à un corps donnant la diazoréaction, probablement voisin du mésobilirubino-gène. D'autre part, elle donne avec les sels de zinc une fluorescence beaucoup plus intense que celle obtenue avec l'urobiline, mais cette dernière a un spectre d'absorption plus fortement marqué à concentration égale.

Tenant compte de ces constatations, nous avons effectué tous nos essais sur de l'urobiline urinaire. Les dosages ont été faits en suivant la technique décrite par TERWEN sans lui faire subir de modification. Dans le but d'éviter toute oxydation, nous avons opéré la réduction sous huile de vaseline, et, pour la même raison, nous avons évité la filtration en centrifugeant le mélange. Il ne faut pas d'ailleurs attribuer une importance exagérée à l'efficacité de l'huile de vaseline comme isolant. Mme LALLEMAND (16) a établi, en effet, que la présence d'une couche d'huile de vaseline à la surface d'un liquide n'empêchait pas, mais retardait seulement l'action oxydante de l'air.

Nous avons, de plus, cherché s'il était possible de déterminer l'intensité colorimétrique par photométrie, cette dernière méthode présentant l'avantage de ne pas exiger de solution étalon.

Nos expériences sont exposées d'après le plan suivant:

- I. — Etude et comparaison des appareils de mesure (colorimètre et photomètre).
- II. — Etude du dosage (stade de réduction non compris).
- III. — Dosages totaux (avec réduction).
- IV. — Influence du temps d'action du mélange réducteur.
- V. — Valeur moyenne de l'erreur.
- VI. — Cas particuliers. Remarques.

I. — Etude et comparaison des appareils de mesure

Avant toutes choses, nous avons voulu savoir si les résultats numériques donnés, soit par le colorimètre,

soit par le photomètre, étaient directement proportionnels à l'intensité de la coloration de la liqueur à doser, c'est-à-dire si l'on pouvait obtenir des résultats réguliers pour des dilutions connues de cette liqueur.

1°) ESSAIS AU COLORIMÈTRE

Nous avons employé le colorimètre de DUBOSCQ et les lectures ont été faites sous une hauteur de 20 mm., en employant les précautions d'usage.

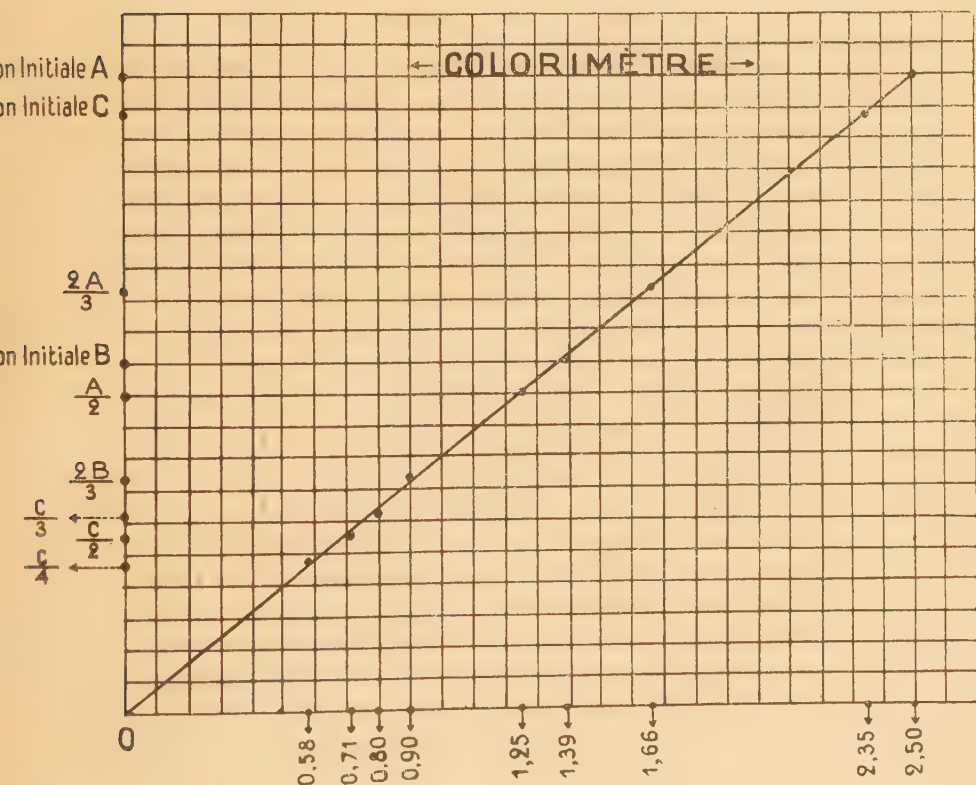
Un dosage effectué dans une urine donne une solution colorée finale A. Les chiffres obtenus pour diverses dilutions sont les suivants, exprimés en unités TERWEN:

Solution A	2 unités	50
Solution $\frac{2 A}{3}$	1 unité	66
Solution $\frac{A}{2}$	1 unité	25

Deux autres séries d'essais sont faites dans les mêmes conditions:

Solution B	1 unité	39
Solution $\frac{B}{2}$	0 unité	71
Solution $\frac{2 B}{3}$	0 unité	90
Solution C	2 unités	35
Solution $\frac{C}{3}$	0 unité	80
Solution $\frac{C}{4}$	0 unité	58

° Si on donne une représentation graphique aux chiffres obtenus, on obtient une droite très régulière allant de 0 unité 60 à 2 unités 50. Pour les solutions moins colorées, les résultats sont beaucoup moins réguliers; il sera donc préférable d'opérer de telle sorte que l'on n'ait pas à faire de lectures inférieures à 0 unité 60, ce qui peut être obtenu en limitant le volume de la solution colorée à 10 et même à 5 cm³, et en prélevant si c'est nécessaire une plus grande quantité d'urine réduite.



2°) ESSAIS AU PHOTOMÈTRE

Une même série d'expériences a été faite avec le photomètre de VERNES, BRICQ et YVON, qui nous a permis des déterminations quantitatives au même titre que le colorimètre mais en évitant l'emploi d'une solution témoin étalonnée. On compare la solution étudiée non plus à une autre solution, mais à une substance solide dont les caractéristiques sont parfaitement fixes et connues. Cette comparaison s'opère en lumière monochromatique sur deux plages lumineuses. Nous ne donnerons qu'une description sommaire de l'appareil (voir son schéma page 41) :

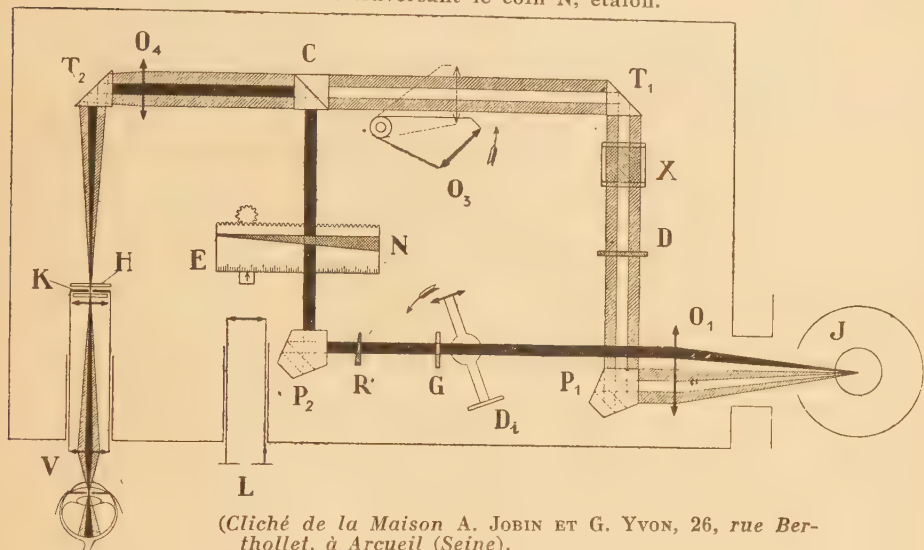
Une source lumineuse fournit un faisceau de lumière blanche qui est partagé en deux parties. Le premier demi-faisceau traverse la substance absorbante à étudier, placée dans une cuve spéciale, et tombe sur un « cube photométrique ». Ce cube photométrique est constitué par deux prismes triangulaires assemblés au Baume du Canada, et dont l'un porte une bande verticale d'argenture, de telle sorte que si l'on observe le cube de ce côté, on distinguera deux plages extérieures éclairées exclusivement par le premier demi-faisceau, et une plage centrale éclairée par le deuxième demi-faisceau. Sur le trajet de ce deuxième demi-faisceau, est intercalé un coin mobile en substance neutre, formant avec un autre coin disposé en sens inverse une lame de corps neutre à faces parallèles. Un dispositif spécial permet d'observer les plages et d'égaliser leur éclat en augmentant plus ou moins l'épaisseur de cette lame à faces parallèles. La valeur de l'absorption estimée en densité optique est alors lue directement sur une échelle solidaire du coin. Nous avons dit que l'on employait une lumière monochromatique; à cet effet, on dispose devant l'ob-

Photomètre d'absorption et de diffusion de Vernes, Bricq et Yvon

MARCHE DES RAYONS LUMINEUX DANS LE PHOTOMÈTRE :

Tracé gris : faisceau lumineux traversant en X le liquide à examiner et se dédoublant et C;

Tracé noir : faisceau traversant le coin N, étalon.



(Cliché de la Maison A. JOBIN ET G. YVON, 26, rue Berthollet, à Arcueil (Seine).)

J : Source lumineuse (lampe de bas voltage placée au foyer de O_1).
O₁ : Objectif collimateur donnant un faisceau de rayons parallèles.

Premier pinceau lumineux.

- P₁** : Prisme pentagonal (équerre optique).
D : Surcharges, que l'on peut à volonté placer ou enlever.
X : Loge métallique, dans laquelle se met la cuve destinée à contenir le liquide à examiner.
T₁ : Prisme triangulaire à réflexion totale.
 Le système X et T₁ se trouve sur une plate-forme mobile susceptible d'être tournée pour lecture en lumière diffusée.
O₃ : Objectif qui s'introduit sur le trajet lumineux dans les mesures en lumière diffusée.
C : Cube fourni par 2 prismes triangulaires accolés par leur face hypothénuse, dont l'une porte en son milieu une bande verticale argentée formant miroir.
O₄ : Objectif dont le foyer est sur la glace H, où il donne une première image de la source lumineuse.
T₂ : Prisme triangulaire à réflexion totale.

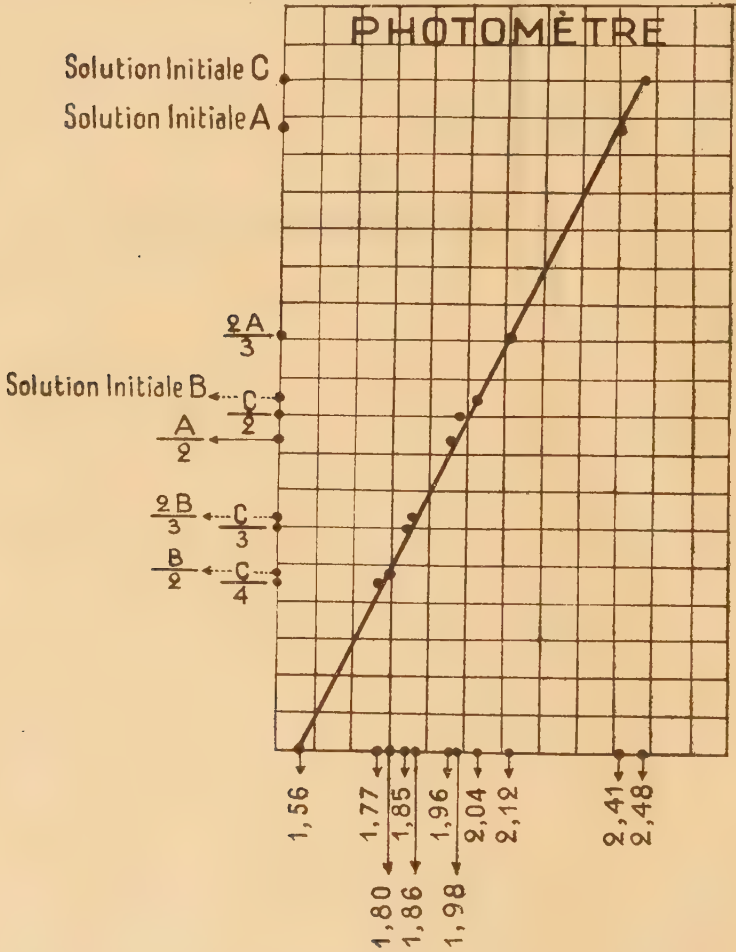
Deuxième pinceau lumineux.

- D₁** : Système pour examens en lumière diffusée.
G : Surcharges que l'on peut à volonté placer ou enlever.
P₂ : Prisme pentagonal (équerre optique).
N : Coin photométrique mobile étalonné.
E : Echelle graduée du coin N.
R : Contre-coin de même angle que N, disposé en sens inverse.

Lunette d'observation.

- V** : Viseur avec son oculaire, où l'œil aperçoit les deux pages d'observation qu'il importe de rendre semblables.
K : Diaphragme de 2 m/m sur lequel s'enclasse un filtre coloré en rouge.
L : Loupe avec laquelle se lisent les résultats.

jectif un filtre de lumière constitué par un écran coloré. Enfin, pour étendre le champ des mesures, on peut intercaler sur les deux demi-faisceaux une sur-



charge constituée par une lame plane parallèle de corps neutre. Les valeurs de ces surcharges sont homogènes avec la graduation de l'échelle.

Pour notre dosage, nous avons essayé les divers écrans mis à notre disposition. L'expérience a montré que l'écran vert était le plus favorable aux mesures. Cet écran laisse passer les radiations dont les longueurs d'onde sont comprises entre $0\ \mu\ 470$ et $0\ \mu\ 500$. Cet intervalle correspond à la meilleure absorption pour notre solution colorée.

De plus, nos examens ont été faits avec une surcharge à droite (premier demi-faisceau) de 1,56.

Voici quelques résultats donnés par des dilutions de la solution colorée dosée. Dans ces chiffres, la surcharge n'a pas été déduite:

Première expérience:

Solution A	2,41
Solution $\frac{2\ A}{3}$	2,12
Solution $\frac{A}{2}$	1,96

Deuxième expérience:

Solution B	2,04
Solution $\frac{B}{2}$	1,80
Solution $\frac{2\ B}{3}$	1,86

Troisième expérience:

Solution C	2,48
Solution $\frac{C}{2}$	1,98
Solution $\frac{C}{3}$	1,85
Solution $\frac{C}{4}$	1,77

Ces résultats donnent pratiquement une droite régulière pour des chiffres allant approximativement de 1,77 à 2,48. Il est préférable de ne pas faire de lecture au-dessous de 1,77, chiffre qui, nous allons le voir, correspond à peu près à 0 unité 60 du colorimètre.

Nous avons, en effet, étalonné le photomètre par rapport au colorimètre.

3°) ETALONNAGE DU PHOTOMÈTRE
PAR RAPPORT AUX UNITÉS TERWEN

Photomètre (degrés de l'échelle photométrique avec surcharge de 1,56)	Colorimètre (Unités TERWEN)
2.04	1.39
1.80	0.71
1.86	0.90
2.68	3.17
2.41	2.50
2.12	1.66
1.85	0.80
2.92	3.38
1.77	0.58

Si nous portons en abscisses les chiffres donnés par le colorimètre et en ordonnées ceux donnés pour des solutions correspondantes par le photomètre, nous obtenons pratiquement une droite sur laquelle nous pourrions transformer en unités TERWEN les chiffres lus au photomètre.

Si nous remarquons que, pour une progression d'une unité au colorimètre, correspond une progression de 0,34 au photomètre, nous aurons, en appelant Y le chiffre donné par le photomètre et X la valeur lui correspondant en unités TERWEN au colorimètre:

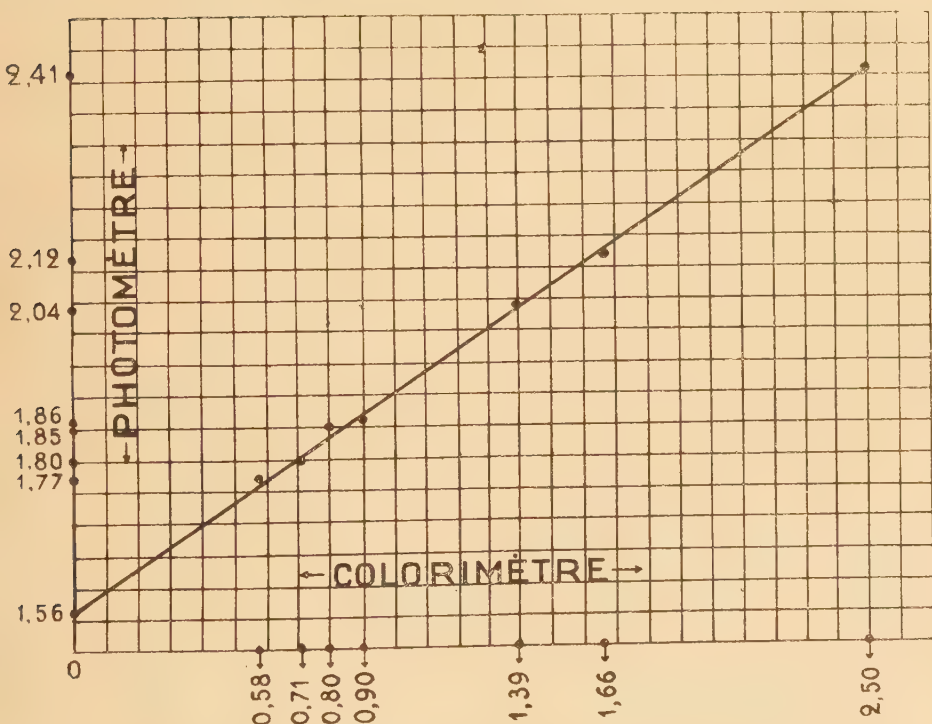
$$X \text{ (unités TERWEN)} = \frac{Y - 1,56}{0,34}$$

une unité correspondant à une concentration de 0 mg. 4 pour 100 cm³ (1).

La concentration en urobiline du liquide à doser rapportée au litre sera donnée par la formule:

$$U \text{ mg} = \frac{(Y - 1,56) 0,4}{0,34}$$

$$U \text{ mg} = (Y - 1,56) 11,76$$



(1) 100 cm³ de la solution colorée finale si le volume de cette solution est égal à celui de l'urine dont on est parti.

Comme pour le colorimètre, il y aura lieu de tenir compte des dilutions effectuées au cours du dosage.

Les résultats sont moins rigoureux pour les solutions trop colorées ou pour les colorations trop faibles, mais sont suffisamment constants dans la zone comprise entre 0 unité 60 et 2 unités 50.

II. — Dosage de l'urobilinogène préformé (sans réduction)

Ces dosages ont été faits directement dans des mélanges d'urine en proportions connues, ou dans des dilutions d'urine faites avec de l'eau.

Voici les résultats de quelques expériences effectuées sur divers échantillons d'urine :

Première expérience :

Dosage n° 1 : à partir de 20 cm³ d'urine.

Dosage n° 2 : à partir de 10 cm³ d'urine.
10 cm³ d'eau.

Résultats. — Dosage n° 1 : une unité.

Dosage n° 2 : 0 unité 48.

Deuxième expérience (dans les mêmes conditions) :

Résultats. — Dosage n° 1 : une unité.

Dosage n° 2 : 0 unité 55.

Troisième expérience :

Résultats. — Dosage n° 1 : une unité.

Dosage n° 2 : 0 unité 49.

Quatrième expérience :

Ici, la dilution par moitié est faite avec une urine ne donnant pas la réaction d'EHRlich.

Résultats. — Dosage n° 1 : une unité.

Dosage n° 2 : 0 unité 48.

Dans ces essais, l'erreur est généralement comprise entre 2 et 4 p. 100; elle s'est élevée une fois au maximum de 10 p. 100. On peut en conclure que le dosage, non compris le stade de réduction, donne des résultats suffisants; l'erreur n'étant sensiblement pas plus élevée que celle donnée par plusieurs dosages dans la même urine.

Ces résultats confirment d'ailleurs les essais de TERWEN établissant que la perte en urobilinogène pendant l'extraction étherée et les lavages ne surpasse pas 3 à 4 p. 100.

III. — Dosages totaux

Des dosages complets effectués dans des mélanges d'urines, ou dans diverses dilutions d'urines, permettent d'étudier la valeur de la réduction, puisque l'on sait négligeable l'erreur donnée par les autres phases du dosage.

a) ESSAIS EFFECTUÉS AVEC DES MÉLANGES D'URINES OU AVEC DES DILUTIONS D'URINES

Première expérience:

Dosage n° 1: à partir de 20 cm³ d'urine.

Dosage n° 2: à partir du mélange: urine, 10 cm³;
eau, 10 cm³.

Résultats. — Après réduction, on prélève un volume double du deuxième échantillon, soit 20 cm³. Les 10 cm³ prélevés dans le premier sont additionnés de 10 cm³ d'eau pour continuer le dosage. Les deux dosages sont faits simultanément. Les liqueurs colorées finales examinées au colorimètre présentent des *colorations identiques*, aux erreurs de mesure près.

Deuxième expérience:

Avec deux urines différentes, on exécute trois dosages dans les conditions suivantes:

Dosage n° 1: urine n° 1, 20 cm³.

Dosage n° 2: urine n° 2, 20 cm³.

Dosage n° 3: urine n° 1, 10 cm³; urine n° 2, 10 cm³.

Pour le dosage n° 3, on a soin de prélever dans le filtrat, après réduction, un volume double de celui utilisé pour les dosages 1 et 2.

Résultats. — Dosage n° 1: 0 unité 50.

Dosage n° 2: traces non dosables.

Dosage n° 3: 0 unité 56.

Troisième expérience:

Dans les mêmes conditions avec une autre urine :

Dosage n° 1: urine à urobiline, 40 cm³.

Dosage n° 2: urine n° 1, 20 cm³; urine normale, 20 cm³.

Dosage n° 3: urine n° 1, 30 cm³; urine normale, 10 cm³ (1).

Dans les trois cas, on exécute le dosage sur 20 cm³ du filtrat après réduction.

Résultats. — Dosage n° 1: une unité.

Dosage n° 2: 0 unité 50.

Dosage n° 3: 0 unité 72.

**b) ESSAIS EFFECTUÉS AVEC DES SOLUTIONS AQUEUSES
DU PIGMENT**

Ces solutions sont obtenues en précipitant les pigments urinaires par du sulfate d'ammoniaque à saturation, en milieu acide, et en dissolvant dans l'eau le

(1) Je désigne sous le nom d'urine normale une urine qui ne donne pas de coloration appréciable avec le réactif d'Ehrlich.

précipité obtenu. Dans ces expériences, on a prélevé, après réduction, des volumes des deux filtrats, tels que les résultats des dosages soient identiques, si la réduction est totale dans les deux cas.

Première expérience:

On part des quantités suivantes:

Dosage n° 1: solution d'urobiline, 10 cm³; eau, 10 cm³.

Dosage n° 2: solution d'urobiline, 15 cm³; eau, 5 cm³.

En prélevant après réduction 10 cm³ du premier et 7 cm³ 5 du second, on obtient:

Dosage n° 1: une unité.

Dosage n° 2: 0 unité 98.

Deuxième expérience:

Dosage n° 1: solution d'urobiline, 20 cm³.

Dosage n° 2: solution d'urobiline, 10 cm³; eau, 10 cm³.

On prélève 10 cm³ du filtrat pour le dosage n° 1 et 20 cm³ pour le dosage n° 2.

On obtient au colorimètre une *coloration identique* dans les deux cas.

Troisième expérience:

Cette dernière expérience, faite dans les mêmes conditions, donne encore une même concentration en urobiline pour les deux dosages.

Dans ces deux séries d'expériences, soit à partir de l'urine, soit à partir d'une solution du pigment, on peut considérer l'erreur comme négligeable. Ces expériences, s'ajoutant à celles de TERWEN, établissent donc que:

1°) Le dépôt d'hydrate ferreux ne retient pas d'urobiline (TERWEN);

2°) La réduction peut être considérée comme complète, puisque les résultats obtenus avec des dilutions diverses d'urine sont proportionnels à la concentration en pigment. °

Cette conclusion sera renforcée, si l'on remarque que, dans les solutions obtenues après précipitation au sulfate d'ammoniaque, le pigment est surtout à l'état d'urobiline et non d'urobilinogène, ce qui augmente l'importance relative de la réduction.

IV. — Influence du temps d'action du mélange réducteur

Nous avons cherché à diminuer le temps exigé pour la réduction en soumettant le mélange (urine-hydrate ferreux) à l'agitation. Les essais ont été faits, soit sur une solution d'urobiline, soit sur des urines dont on avait transformé par oxydation l'urobilinogène en urobiline; ils nous ont permis de résoudre ainsi deux questions:

1°) Peut-on diminuer le temps de la réduction?

2°) Peut-on récupérer intégralement par réduction l'urobilinogène transformé au préalable en urobiline par oxydation?

Les premiers essais ont été faits sur une solution d'urobiline dans de la soude au millième. Ils ont montré que 45 minutes d'agitation ne remplacent pas 24 heures de contact; en effet:

Premier essai:

a) Après 45 minutes d'agitation: 1 unité 08;

b) Sur la même solution, après 24 heures de contact sans agitation: 1 unité 44.

Deuxième essai:

a) Dosage après 45 minutes d'agitation: 1 unité;

b) Dosage après 1 h. 30 d'agitation: 1 unité 21.

Troisième essai:

a) Dosage après 1 h. 30 d'agitation: 0 unité 65;

b) Dosage après 24 heures de contact sans agitation: 0 unité 68.

Il faut donc approximativement 1 h. 30 d'agitation pour remplacer 24 heures de contact. Ceci se confirme par des essais sur des urines dont l'urobilinogène a été complètement transformé en urobiline par oxydation:

20 cm³ d'urine sont additionnés d'une goutte d'acide chlorhydrique et d'une goutte de la solution officinale de perchlorure de fer; après un quart d'heure de contact, on constate que l'urine ainsi traitée ne donne plus la réaction d'EHRlich.

Sur une urine ainsi oxydée on a effectué les expériences suivantes:

Première expérience:

Dosage après 1 h. 30 d'agitation: 0 unité 62.

Dosage après 24 heures au repos: 0 unité 63.

Deuxième expérience :

On fait trois déterminations :

a) *Après 1 h. 30 d'agitation* (urine oxydée au préalable au perchlorure de fer):

Résultat: 5 unités 20.

b) *Après 24 heures de contact sans agitation* (urine traitée comme dans l'expérience a):

Résultat: 5 unités 10.

c) *Après 24 heures de contact sans agitation* (l'urine n'étant pas oxydée):

Résultat: 5 unités 55.

On voit que 1 h. 30 d'agitation donne une réduction suffisante. De plus, ces dernières expériences éta-

blissent que l'urobilinogène transformé en urobiline par le perchlorure de fer est susceptible d'être transformé à nouveau intégralement en urobilinogène par la méthode habituelle de réduction.

Ces essais étant terminés, nous avons remarqué qu'après deux heures, le précipité d'hydrate ferreux n'était pas séparé du liquide sous forme de dépôt; nous avons pensé alors qu'il n'était peut-être pas nécessaire d'agiter pour activer la réduction. Deux dosages faits dans la même urine oxydée au perchlorure de fer, l'un après une réduction de 2 heures sans agitation, et l'autre après 24 heures, nous ont donné tous deux un *résultat identique* au photomètre.

D'ailleurs, si l'auteur prescrit un délai de 24 heures pour la réduction lorsqu'il expose la technique du dosage, il faut remarquer que dans tous les essais faits sur cette réduction à partir de l'urobiline même, il poursuit le dosage après seulement 2 heures de contact avec l'hydrate ferreux.

V. — Valeur moyenne de l'erreur sur plusieurs dosages dans la même urine

Première expérience:

Deux prélèvements de 20 cm³ d'une même urine sont réduits et dosés simultanément. Nous obtenons:

Dosage n° 1: 5 mg. 88 d'urobiline par litre.

Dosage n° 2: 6 mg. 11 d'urobiline par litre.

Erreur: 3,76 p. 100.

Deuxième expérience (dans les mêmes conditions):

Dosage n° 1: 7 mg. 64 d'urobiline par litre.

Dosage n° 2: 7 mg. 99 d'urobiline par litre.

Erreur: 4,37 p. 100.

Troisième expérience:

Dosage n° 1: 4 mg. 82 d'urobiline par litre.

Dosage n° 2: 4 mg. 82 d'urobiline par litre.

Erreur: nulle.

VI. — Cas particuliers. Remarques

Il convient d'ajouter à cette étude quelques remarques faites au cours des manipulations, et de signaler les difficultés que nous avons rencontrées.

1° URINES ALBUMINEUSES

Dans le cas des urines albumineuses, l'épuisement à l'éther est presque impossible, une émulsion se forme dès le début de l'agitation et avec d'autant plus de facilité naturellement que la proportion d'albumine est plus grande. Ces émulsions se détruisent très difficilement et, d'autre part, le dosage se prolongeant, une partie du chromogène peut s'oxyder, ce qui fausse les résultats. Nous avons essayé de nous débarrasser de l'albumine sans faire disparaître l'urobiline. Tous les essais dans ce sens ont été vains, nous les signalerons simplement; ils permettent, de plus, de se rendre compte de l'extrême facilité avec laquelle l'urobiline disparaît.

a) *Essai de fixation de l'urobiline par le talc.* — L'urine acide est agitée avec le 1/10 de son poids de talc pendant une heure. Un dosage dans l'urine primitive et un dosage dans l'urine traitée montrent que le talc a retenu seulement 10 p. 100 de l'urobiline.

b) *Défécation de l'albumine par l'acide tungstique.* — Il y a disparition de la plus grande partie de l'urobiline.

c) *Coagulation de l'albumine par la chaleur en*

présence d'acide acétique. — La totalité du liquide et du coagulum est traitée par le mélange réducteur, un essai de dosage dans le filtrat montre la disparition complète de l'urobiline.

d) *Essai d'une défécation au ferrocyanure de zinc*
D. RAQUET (17), dans les proportions suivantes :

Urine.	100 cm ³
Ferrocyanure de zinc à 15 p. 100.	2 cm ³

On filtre et on ajoute :

Acétate de zinc à 30 p. 100	5 cm ³
---------------------------------------	-------------------

Dans l'urine ainsi déféquée, la perte en urobiline est supérieure à 50 p. 100.

e) *Essai de fixation de l'albumine par les hydroxydes de métaux trivalents* (WUNSCHENDORFF) (18). — On ajoute à l'urine une solution d'alun de potasse à 5 p. 100 jusqu'à ce que le trouble formé par cette addition disparaisse; à ce moment on ajoute progressivement de la soude N/10 de manière à atteindre un $\text{pH} = 7$. Plusieurs essais de défécation par cette méthode ont montré une perte en urobiline allant de 19 à 25 p. 100.

f) *Défécation de l'albumine par l'acide trichloracétique au 1/5* (20 g. pour 100 cm³). — Nous avons constaté une destruction presque complète de l'urobiline.

Aucun des procédés utilisés ne permettant de se débarrasser de l'albumine sans faire disparaître plus ou moins l'urobiline, nous avons simplement cherché à détruire l'émulsion, ce qui a été obtenu de la façon suivante :

On épuise à la manière habituelle (60 renversements), sans se préoccuper de l'émulsion qui se

forme. On laisse reposer une ou deux minutes, il se forme trois couches : une couche supérieure éthérée, une couche intermédiaire constituée par l'émulsion, et une couche aqueuse inférieure limpide que l'on soutire. On lave alors en agitant, quatre fois, avec 3 cm³ d'eau chaque fois, on laisse reposer, on sépare la couche aqueuse. On agite ensuite l'émulsion avec un égal volume d'éther, elle se détruit facilement, il suffira de tenir compte de cette dilution dans les calculs.

2° URINES RENFERMANT DE LA NOVOCÂINE

Nous avons eu l'occasion de faire des recherches d'urobiline dans des urines de malades ayant subi une rachianesthésie à la novocaïne. Dans ce cas, le dosage de l'urobiline est impraticable. La novocaïne s'élimine par voie urinaire en partie non décomposée, et en partie dédoublée en ses constituants. La novocaïne base, soluble dans l'éther, est entraînée dans le dosage; or, l'addition du réactif d'EHRlich fait apparaître une coloration jaune intense, se superposant à la coloration rouge donnée par l'urobilinogène, et rendant tout dosage impossible.

3° URINES CONTENANT DE L'INDOL

Il est assez rare de rencontrer des urines contenant de l'indol; nous avons eu cependant l'occasion d'examiner une de ces urines dans laquelle nous avons caractérisé l'indol de la façon suivante :

10 cm³ d'urine additionnés de X gouttes d'une solution de nitroprussiate de soude à 5 p. 100 ont été alcalinisés par X gouttes de lessive de soude; il s'est alors produit une coloration violette caractéristique de l'indol.

Cette urine, qui ne contenait pas d'urobilinogène

(pas de fluorescence avec les sels de zinc après oxydation à l'iode), donnait une réaction d'EHRlich très intense due à l'indol.

Nous pensions que le dosage de l'urobiline était impossible dans ces urines, il n'en est rien. Nous nous sommes aperçus, en effet, que la coloration donnée par l'indol en présence du réactif d'EHRlich disparaissait après neutralisation. Cette décoloration peut être obtenue avec un alcali quelconque (soude, ammoniacque, etc.); il suffit de neutraliser l'acidité du réactif.

Dans les mêmes conditions, la coloration donnée par l'urobilinogène est stable. Le dosage s'opérant en milieu neutre, puisque l'acide chlorhydrique est neutralisé à la fin par addition d'acétate de soude, il nous était possible de penser que la réaction donnée par l'indol n'intervenait pas. C'est d'ailleurs ce qui nous a été confirmé par les deux dosages suivants, effectués à partir d'une même urine, à urobiline:

Dosage n° 1: urine, 15 cm³; eau, 5 cm³.

Dosage n° 2: urine, 15 cm³; solution saturée d'indol, 5 cm³.

Après réduction, les deux dosages opérés simultanément ont donné:

Dosage n° 1: 13 mg. 64 d'urobiline par litre.

Dosage n° 2: 13 mg. 12 d'urobiline par litre.

Il résulte de cette remarque que la caractérisation de l'urobilinogène par le réactif d'EHRlich dans les conditions ordinaires est sujette à une erreur due à la présence d'indol. Cette erreur n'existe plus si l'on ajoute une quantité suffisante d'acétate de soude pour faire disparaître tout l'acide chlorhydrique libre du réactif. La coloration rouge doit persister s'il y a de l'urobilinogène.



EN RÉSUMÉ :

De tous ces essais on peut tirer les conclusions suivantes :

1°) La méthode de réduction employée permet de transformer complètement l'urobiline urinaire en son chromogène.

2°) L'urobilinogène ainsi formé est entraîné intégralement au cours des manipulations jusqu'à la réaction colorée finale.

3°) L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en urobilinogène du liquide à doser, et la mesure de cette intensité donne des résultats qui sont en raison directe de cette concentration.

4°) La réduction permet de retrouver quantitativement l'urobilinogène qui a été au préalable oxydé par le perchlorure de fer.

Il est certain que la sensibilité de la réaction ne permet pas de déceler l'urobilinurie dite physiologique. Les méthodes par fluorescence sont beaucoup plus sensibles. En effet, les urines normales ne donnent pas la coloration rouge d'une réaction positive, mais une coloration jaunâtre ne se prêtant pas au dosage. Cette méthode, qui est simple et régulière, permet néanmoins l'évaluation des urobilinuries pathologiques les plus faibles.

L'erreur peut être considérée comme inférieure à 5 p. 100 pour des urobilinuries de l'ordre de 4 à 5 mg. par litre, ce qui est suffisant au point de vue clinique. Il semble que la limite de sensibilité du dosage corresponde à peu près à des déterminations de 0 unité 20, c'est-à-dire 0 mg. 8 d'urobiline par litre. Or, d'après ROYER, les sujets normaux peuvent éli-

miner de 0 mg. 2 à 0 mg. 6 d'urobiline par vingt-quatre heures sans que l'on doive regarder cette quantité comme anormale. Il en découle que la possibilité d'effectuer le dosage implique une urobilinurie pathologique, et que le dosage limite correspond approximativement à la concentration maxima en urobiline d'une urine normale.

CHAPITRE IV

ESSAIS DE PREPARATION DE L'UROBILINE

1° Essais d'extraction de l'urobiline des matières fécales.

Nous avons cherché à préparer de l'urobiline à partir des matières fécales en suivant la technique indiquée par TERWEN. Nous n'en avons obtenu que de très faibles quantités, et de plus, des dosages à partir de cette urobiline nous ont montré qu'elle était très impure. Il se peut d'ailleurs que cette urobiline, obtenue après exposition de trois semaines à la lumière diffuse, ait été en partie décomposée par la lumière, puisque l'auteur, dans les mêmes conditions, obtient un produit dont la pureté n'est que de 50 à 60 p. 100. L'échantillon le plus pur qu'il ait préparé (environ 90 p. 100) a été obtenu à l'obscurité, mais la précipitation dans ce cas fut très lente et n'était pas encore terminée après une année.

Nous n'avons pas nous-même réalisé cette préparation. Néanmoins, au cours de nos essais de préparation, nous avons rencontré une urobiline présentant des caractères de solubilité qui méritent, semble-t-il, d'être signalés, car le fait vient appuyer l'hypothèse généralement admise de la pluralité des urobilines. Voici dans quelles conditions nous avons fait cette observation :

1°) Les matières (100 g.) traitées par deux fois et

demie leur poids de sulfate de soude anhydre ont été transformées en une poudre sèche.

2°) Cette poudre a été traitée par l'éther de pétrole pour éliminer les graisses. L'éther de pétrole enlève peu de stercobilinogène, les matières contenant surtout de la stercobiline.

3°) La poudre ainsi dégraissée a été épuisée au chloroforme et la solution chloroformique, très riche en urobiline, donne avec l'acétate de zinc une magnifique fluorescence.

4°) L'extractum chloroformique agité avec de la soude à 12 p. 100 ne lui cède rien.

Devant ce fait, nous avons essayé de traiter le chloroforme par de l'acide phosphorique à 15 p. 100, dans l'espoir de lui enlever des substances basiques hypothétiques. Le chloroforme décanté et agité de nouveau avec de la soude à 12 p. 100 ne lui cède toujours rien.

Nous avons alors essayé de remplacer l'acide phosphorique par de l'alcool tartrique au 1/10 (1) et en opérant non plus sur le chloroforme, mais sur la poudre elle-même dégraissée à l'éther de pétrole. Cette opération a été effectuée au mortier. Dans ce cas, l'urobiline ne passe pas encore dans la soude, mais elle reste dans les savons insolubles qui se sont formés au sein du liquide, le chloroforme lui-même en retenant très peu.

Nous n'avons jamais vu signaler cette insolubilité de l'urobiline dans les alcalis; elle met en évidence une fois de plus la complexité de la question.

(1) Acide tartrique, 10 g.; alcool à 90°, q. s. pour 100 cm³.

2° Essais d'extraction de l'urobiline urinaire.

Certaines urines sont extrêmement riches en urobiline, et il nous a paru intéressant d'essayer une extraction analogue à celle de la stercobiline. Nous avons d'abord concentré sous un petit volume la totalité de l'urobiline, soit par précipitation au sulfate d'ammoniaque, soit par extraction chloroformique.

a) *Précipitation au sulfate d'ammoniaque*

On sait que le sulfate d'ammoniaque à saturation en milieu acide précipite tous les pigments urinaires, à l'exception de l'urochrome.

Nous avons saturé ainsi 750 cm³ d'urine par 573 g. de sulfate d'ammoniaque. Le précipité a été dissous dans 200 cm³ d'eau distillée et la solution réduite par la méthode habituelle, c'est-à-dire :

Solution	200 cm ³
Solution de sel de Mohr	200 cm ³
Soude à 12 p. 100	200 cm ³

Après avoir laissé en contact vingt-quatre heures, on filtre. On a un filtrat de 375 cm³ auquel on ajoute de l'acide chlorhydrique au 1/4 jusqu'à ce que la réaction ne soit plus que légèrement alcaline, puis on acidifie fortement à l'acide tartrique. Cette solution est agitée avec 750 cm³ d'éther de pétrole; après repos, celui-ci est séparé, lavé et séché sur du sulfate de soude anhydre. L'éther de pétrole est alors distillé dans le vide jusqu'à 160 cm³.

Pour effectuer ces opérations, on évite autant que possible une lumière trop vive. La solution concentrée d'urobilinogène dans l'éther de pétrole est ensuite placée à la lumière diffuse, peu à peu le chro-

mogène s'oxyde et l'urobiline insoluble se dépose. Lorsque l'éther de pétrole surnageant ne donne plus la réaction d'EHRlich on sépare le précipité sur un creuset de Gooch préalablement taré, on sèche dans le vide sulfurique et on pèse.

Dans le cas présent, nous avons obtenu 23 mg. 9 d'urobiline provenant de 750 cm³ d'urine.

b) *Extraction chloroformique*

Ce mode d'extraction nous a paru plus simple, plus sélectif, et surtout plus rapide. L'urine étant acide (sinon acidifier légèrement à l'acide phosphorique), on épuise au chloroforme jusqu'à ce que celui-ci ne donne plus de réaction avec les sels de zinc. L'extractum est agité avec de la soude à 12 p. 100 qui enlève l'urobiline. Cette solution alcaline est alors additionnée d'un volume égal d'eau et d'un même volume de la solution de sel de Mohr à 16 p. 100. Il ne nous a pas été possible ici d'ajouter les réactifs dans l'ordre indiqué par TERWEN, l'addition préalable de soude étant nécessaire pour entraîner l'urobiline. Malgré les remarques faites par TERWEN à ce sujet, nous avons constaté que la réduction était complète.

Après vingt-quatre heures de contact, on poursuit la préparation comme plus haut.

Dans une expérience effectuée selon cette technique, nous avons obtenu à partir de 1.000 cm³ d'urine 27 mg. 3 d'urobiline.

3° **Destruction de l'urobiline en solution dans le phosphate de soude.**

Ayant mis une petite quantité d'urobiline en solution dans du phosphate de soude à 1 p. 100, nous

avons constaté qu'elle ne donnait plus de réactions après vingt-quatre heures. Pour nous rendre compte alors de l'importance et de la rapidité de cette destruction, nous avons préparé l'expérience suivante:

Une petite quantité d'urobiline est mise en solution dans du phosphate de soude à 1 p. 1000. A partir de cette solution on opère deux dosages, l'un sur un volume de solution double de l'autre, et par conséquent contenant des quantités doubles d'urobiline et de phosphate disodique. Après réduction, on prélève des volumes tels que la teneur en urobiline soit la même dans les deux cas. Si le phosphate de soude n'exerçait aucune action, on devrait trouver un résultat identique pour les deux dosages.

Nous avons opéré comme il suit:

Dosage n° 1 :

Solution d'urobiline	20 cm ³
Solution de sel de Mohr	5 cm ³
Soude à 12 p. 100	5 cm ³

Dosage n° 2 :

Solution d'urobiline	10 cm ³
Eau distillée	10 cm ³
Solution de sel de Mohr	5 cm ³
Soude à 12 p. 100	5 cm ³

Après vingt-quatre heures on prélève:

5 cm³ du filtrat n° 1.

10 cm³ du filtrat n° 2.

En suivant la technique habituelle et dans trois expériences différentes, nous avons obtenu les résultats suivants:

Si on considère comme *une unité* la concentration du dosage n° 2, nous trouvons pour le premier:

0	unité	73
0	—	75
0	—	72

Il paraît donc que la présence de 10 cm³ de phosphate disodique à 1 p. 1.000 en plus dans le premier cas entraîne une destruction d'urobiline de 25 à 28 p. 100.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons recommencé l'expérience dans d'autres conditions. La dilution a été faite dans ce cas, non plus avec de l'eau distillée, mais avec une solution de phosphate de soude à 1 p. 1.000.

Dosage n° 1 :

Solution d'urobiline	20 cm ³
Solution de sel de Mohr	5 cm ³
Soude à 12 p. 100	5 cm ³

Dosage n° 2 :

Solution d'urobiline	10 cm ³
Solution de phosphate de soude à 1 p. 1.000	10 cm ³
Solution sel de Mohr	5 cm ³
Soude à 12 p. 100	5 cm ³

Après vingt-quatre heures, en opérant le dosage sur 5 cm³ du filtrat dans le premier cas, et sur 10 cm³ dans le second, on a obtenu au colorimètre des *colorations identiques*, ce qui prouve que le phosphate disodique exerce une action destructrice sur l'urobiline. Nous avons voulu savoir si l'action du phosphate monosodique était la même et, dans ce but, nous avons effectué trois expériences dans lesquelles la même quantité d'urobiline a été dosée en présence de phosphate disodique, en présence de phosphate disodique et monosodique en quantités égales, et enfin en présence de phosphate monosodique seul.

Voici le détail de ces expériences:

On prépare une solution d'urobiline dans du phosphate disodique à 2 p. 1.000 et à partir de celle-ci:

1° *Dosage* (phosphate disodique) :

Solution d'urobiline	10 cm ³
Eau distillée	10 cm ³
Solution de sel de Mohr	5 cm ³
Soude à 12 p. 100	5 cm ³

2° *Dosage* (phosphate disodique, phosphate monosodique en quantités égales) :

Solution d'urobiline	10 cm ³
Acide phosphorique	0 cm ³ 5
Eau distillée	9 cm ³ 5
Solution de sel de Mohr	5 cm ³
Soude à 12 p. 100	5 cm ³

3° *Dosage* (phosphate monosodique) :

Solution d'urobiline	10 cm ³
Acide phosphorique	1 cm ³
Eau distillée	9 cm ³
Solution de sel de Mohr	5 cm ³
Soude à 12 p. 100	5 cm ³

Nous obtenons comme résultats:

Dosage n° 1: 0 unité 80.

Dosage n° 2: 0 — 72.

Dosage n° 3: 0 — 62.

Donc, en solution dans du phosphate monosodique, la perte en urobiline après vingt-quatre heures se trouve encore augmentée de plus de 20 p. 100 sur celle produite avec le phosphate disodique.

Nous avons essayé alors d'employer la soude au millième comme solvant. Une série de dosages faite dans les mêmes conditions que précédemment nous a permis de constater que la soude n'avait pas la même action destructrice. Ce fait était d'ailleurs facile à prévoir, puisque nous savons que dans la réduction on emploie de la soude à 12 p. 100 sans inconvénient.

CHAPITRE V

APPLICATIONS CLINIQUES

Il nous a paru intéressant, après mise au point de cette méthode, de l'appliquer à l'étude de l'urobilinurie pathologique.

Avant cette étude clinique, nous n'entreprendrons pas l'examen des multiples théories ayant trait à l'origine de l'urobiline; elles sont exposées d'une manière très complète dans l'ouvrage de ROYER: *L'urobiline à l'état normal et pathologique* (4). Nous n'avons pas l'intention de prendre parti dans ces controverses qui sortiraient du cadre de notre travail. Nous nous contenterons de présenter quelques observations personnelles, applications de notre dosage. Ces observations ont porté sur les deux points suivants:

- I. — Action des anesthésiques sur l'urobilinurie;
- II. — Quelques cas d'ictères par rétention.

I. — ACTION DES ANESTHÉSQUES SUR L'UROBILINURIE

On connaît depuis longtemps l'action des toxiques sur la cellule hépatique. On admet également une corrélation entre les altérations du foie et l'urobilinurie. Le cas particulier des anesthésiques nous a retenu, quoique déjà étudié par de nombreux auteurs.

A) Influence du chloroforme

DOYON, GAUTIER et POLICARD (19), travaillant sur des chiens, ont constaté après anesthésie chloroformique la présence d'urobiline dans le sang et une

augmentation assez importante de l'urobilinurie. ROYER, dans les mêmes conditions, a obtenu des résultats concordants. Nos expériences ont porté uniquement sur des malades opérés (la durée moyenne des anesthésies étant de trente à quarante-cinq minutes). Malgré l'intérêt qu'aurait pu présenter l'examen des urines de vingt-quatre heures, des difficultés inhérentes au service nous ont limité à l'examen de la dernière urine émise avant l'opération et de la première émise après. Celle-ci est généralement recueillie dix à douze heures après l'intervention.

Nous rappelons qu'une excrétion d'urobiline inférieure à 1 mg. par litre doit être regardée comme normale. Voici les chiffres obtenus dans sept anesthésies différentes :

	<i>Avant opération</i>	<i>Après opération</i>
Observ. 1 :	traces non dosables	traces non dosables
— 2 :	1 mg 0/00	0 mg 92 0/00
— 3 :	0 mg 96	0 mg 92
— 4 :	8 mg 32	10 mg 48
— 5 :	4 mg 80	8 mg 88
— 6 :	traces non dosables	traces non dosables
— 7 :	0 mg 92	7 mg 68

Nous remarquons que l'élévation de l'urobilinurie est loin d'être constante: il semble que chez les sujets normaux, elle ne soit qu'une exception; par contre, là où nous trouvons une urobilinurie pathologique avant anesthésie, nous constatons une très sérieuse augmentation de celle-ci après chloroformisation. Il semblerait donc qu'un foie normal puisse supporter sans perturbation une anesthésie au chloroforme, anesthésie qui ne serait toxique que pour un foie déjà déficient.

B) Influence de l'éther

DOYON et GAUTIER (20) n'ont observé aucune aug-

mentation de l'urobilinurie chez le chien après ingestion de 20 cm³ d'éther mélangés à 20 cm³ d'huile. ROYER obtient des résultats identiques après anesthésie du chien; chez l'homme, il observe une augmentation très peu importante.

Nous avons fait des dosages sur six opérés; les urines ont été recueillies comme dans le cas du chloroforme:

	<i>Avant opération</i>	<i>Après opération</i>
Observ. 1 :	1 mg 12 0/00	0 mg 72 0/00
— 2 :	traces non dosables	0 mg 80
— 3 :	0 mg 80	0 mg 80
— 4 :	0 mg 80	1 mg 64
— 5 :	traces non dosables	traces non dosables
— 6 :	traces non dosables	3 mg 56

L'éther ne donne généralement pas d'urobilinurie ou l'augmentation est très minime; un seul cas sur les six observations montre une augmentation importante.

C) *Influence du chlorure d'éthyle*

Deux observations sur l'anesthésie au chlorure d'éthyle ont montré une action très nette sur l'urobilinurie:

	<i>Avant opération</i>	<i>Après opération</i>
Observ. 1 :	traces non dosables	1 mg 40 0/00
— 2 :	traces non dosables	4 mg 44

Ces résultats sont d'autant plus significatifs que le chlorure d'éthyle n'est employé que pour les interventions de courte durée.

D) *Influence du mélange de Schleich* (chloroforme, éther, chlorure d'éthyle)

	<i>Avant opération</i>	<i>Après opération</i>
Observ. 1 :	1 mg	0 mg 80
— 2 :	traces non dosables	6 mg 88

Dans ce cas, les observations sont trop peu nombreuses pour permettre de conclure; nous n'avons pas pu les multiplier. Il semble néanmoins que l'on doive prévoir une augmentation de l'urobilinurie.

E) Influence du protoxyde d'azote

Nous n'avons pu observer qu'une seule anesthésie au protoxyde d'azote; l'urobiline urinaire, qui n'était pas dosable avant l'opération, n'avait pas augmenté après.

F) Influence de l'anesthésie rachidienne

Ces anesthésies se font à la novocaïne et, comme nous l'avons déjà signalé, il nous est impossible d'effectuer notre dosage en présence de novocaïne. Les expériences de ROYER lui ont montré que ce genre d'anesthésie ne donnait pas d'augmentation de l'urobilinurie.

II. — LES ICTÈRES

Il existe de nombreuses formes cliniques d'ictères; nous n'entreprendrons point de les décrire et encore moins de les étudier; nous avons eu seulement l'occasion d'observer deux cas d'ictères « par rétention ». Ce sont ces observations que nous voulons exposer ici.

Dans les ictères par rétention, il y a obstacle à l'excrétion biliaire, obstacle pouvant provenir de causes diverses: tumeurs, calculs, etc. La bile ne pouvant plus s'écouler, il y a décoloration des matières par absence de stercobiline. D'une manière générale, pendant l'obstruction, il n'y a pas urobilinurie, elle apparaît seulement lorsque cesse l'obstruction et se prolonge jusqu'à ce que le foie ait récupéré son intégrité fonctionnelle. Comme le remarque CARRIÉ (22),

l'urobilinurie nécessite pour se produire la réunion de deux conditions :

- trouble de la fonction hépatique,
- perméabilité des voies biliaires.

Au cours de nos observations, nous avons examiné parallèlement l'excrétion des pigments et des sels biliaires et l'urobilinurie. Les pigments biliaires ont été recherchés par la réaction de GRIMBERT; nous en avons apprécié approximativement la quantité par l'intensité de la réaction colorée. Pour les sels biliaires nous en avons déterminé la teneur d'après la réaction de HAY. Toutes ces recherches ont été effectuées sur les urines de vingt-quatre heures. Les résultats en sont consignés dans le tableau de la page ci-contre.

Ces deux observations confirment ce que nous savions des ictères par rétention: l'urobiline apparaît nettement à la désobstruction qui est signalée par la régression des pigments biliaires.

URINE DU :	SELS BILIAIRES	PIGMENTS BILIAIRES	UROBILINE PAR LITRE
Première Observation			
5 janvier	+++ Présence très abondante.	+++ Présence très abondante.	0 mg. 80
7 janvier	++ Présence nette.	++ Présence nette.	0 mg. 72
8 janvier	0	Traces nettes.	9 mg. 36
10 janvier	0	Très faibles traces.	10 mg.
12 janvier	0	0	Traces non dosables.
14 janvier	0	0	Traces infimes.
Deuxième Observation			
1 ^{er} mars	+++ Présence très abondante.	+++ Présence très abondante.	Traces non dosables.
2 mars	+++ Présence très abondante.	+++ Présence très abondante.	Traces non dosables.
3 mars	++ Présence nette.	++ Présence nette.	Traces non dosables.
5 mars	+ Présence (lég ^{re} diminution).	+ Présence (lég ^{re} diminution).	2 mg. 64
7 mars	+ Présence faible.	+ Présence faible.	7 mg. 60
8 mars	Traces.	Traces.	10 mg. 60
9 mars	0	0	7 mg. 20
10 mars	0	0	1 mg. 84
13 mars	0	0	Traces non dosables.

RESUME ET CONCLUSIONS

En résumé, à la suite de ce travail, qui a principalement pour but l'étude du dosage de l'urobiline urinaire proposé par TERWEN, nous sommes arrivée aux conclusions suivantes :

I. — Cette méthode donne des résultats suffisamment constants, l'erreur maxima paraît être de l'ordre de 5 p. 100, précision suffisante pour la clinique.

II. — La spécificité assez grande du réactif permet le dosage dans la grande majorité des cas.

III. — La sensibilité du réactif ne permet pas le dosage des urobilinuries physiologiques; toutefois, la méthode est valable pour toutes les urobilinuries pathologiques, même les plus faibles. Il est possible de doser l'urobiline dans des urines n'en contenant que 0 mg. 8 par litre, ce qui dépasse à peine la teneur normale, puisque ROYER admet une élimination journalière moyenne de 0 mg. 2 à 0 mg. 6.

IV. — La technique de ce dosage est simple et rapide, puisque nous avons établi que la réduction de l'urobiline en urobilinogène s'opérait complètement en deux heures.

D'autre part, nous avons fait quelques essais sur l'extraction de l'urobiline fécale qui nous ont permis de signaler l'existence d'une stercobiline spéciale insoluble dans la soude et donnant néanmoins les réactions habituelles.

Nous avons complètement établi une technique pour l'extraction de l'urobiline urinaire en utilisant un procédé analogue à celui employé pour l'extrac-

tion de la stercobiline, l'urobiline étant préalablement concentrée sous un petit volume, soit par précipitation au sulfate d'ammoniaque et redissolution, soit par épuisement chloroformique de l'urine.

Nous avons observé que l'urobiline était détruite par le phosphate disodique; ce corps est donc à rejeter comme solvant. La soude, au contraire, n'ayant aucune action nuisible, peut être employée sans inconvénient.

Enfin, nous avons appliqué la méthode TERWEN à l'étude de quelques cas d'urobilinurie, soit au cours de l'anesthésie, soit au cours de l'ictère « par rétention », ce qui nous a permis de préciser par des chiffres les données précédemment acquises.

Vu : *Le Doyen*,
P. GUÉRIN.

Vu : *Le Président de Thèse*,
H. HÉRISSEY.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
CHARLÉTY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. H. FISCHER et R. HESS : Über Neo-, xantho-neobilirubinsäure und Partialsynthese des Mesobilirubins und Mesobilirubinogens (Urobilinogens). — *Z. physiol. Chem.*, 1931, **194**, pp. 193-228.
2. H. FISCHER et E. ADLER : Synthese des Mesobilirubinogens und der Neobilirubinsäure eines Mesobilirubins und einer Neoxanthobilirubinsäure sowie von (1,8) Dioxy-tripyrro-di-enen. — *Z. physiol. Chem.*, 1931, **200**, pp. 209-231.
3. M. JAVILLIER : De l'hématine à la bilirubine et à l'urobiline. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, pp. 664-703.
4. M. ROYER : L'urobiline à l'état normal et pathologique. — *Thèse Fac. Méd. Buenos-Ayres*, 1929.
5. M. ROYER : Simplification de la méthode du dosage de l'urobiline. — *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **3**, pp. 825-827.
6. DESCOMPS, GOIFFON et BROUSSE : Le dosage de l'urobiline dans l'urine et les matières fécales. — *Jour. de Pharm. et Chim.*, 1924, **30**, p. 97.
7. CHARNAS : Ueber die Darstellung das Verhalten und die quantitativen Bestimmung des reinen Urobilin in Urobilinogen. — *Bioch. Zeit.*, 1909, **20**, p. 401.
8. FLATOW et BRUNELL : Eine klinisch eingache Methode quantitative Urobilinogenbestimmung. — *Münch. med. Wochen.* 1913, **60**, p. 234.
9. R.L. WILBUR et T. ADDIS : Urobilin — its clinical significance. — *Arch. of int. Med.*, 1914, **13**, p. 235.
10. G.B. WALLACE et J.S. DIAMOND : The significance of urobilinogen in the urine as a test of liver function with a description of a simple quantitative method for its estimation. — *Arch. of int. Med.*, 1925, **35**, p. 698.
11. A. ADLER et M. BRESSEL : Urobilinogenbestimmung in Stuhl und Harn mittels der neuen Extraktionsmethode. — *Deutsch. Arch. Klin. Med.*, 1927, **155**, p. 326.
12. A. ADLER : Ein Colorimeter ohne Vergleichsflüssigkeit für die Klinische Diagnostik. — *Z. ges. exptl. Med.*, 1927, **55**, pp. 672-693.

13. A.J.L. TERWEN : Über ein neues Verfahren zur quantitativen Urobilinbestimmung ind Harn und Stuhl. Über die Bereitung und die Eigenschaften von einem möglichst reinen Urobilinpräparat. — *Deutsch Arch. klin. Med.*, 1925, **149**, pp. 72-101.
14. A.J.L. TERWEN et A. LICHTENSTEIN : Über Blutmauserung und Urobilinausscheidung. — *Deutsch Arch. klin. Med.*, 1925, **149**, pp. 102-112.
15. C.J. WATSON : Sur la stercobiline, la copromésobilivoline et la copronigrine. — *Z. physiol. Chem.*, 1932, **208**, pp. 101-119; d'après *Bull. Soc. Chim. de France*, 1933, **54**, p. 218.
16. S. LALLEMAND : Sur l'efficacité d'une couche d'huile de paraffine utilisée comme agent de protection contre l'oxygène de l'air. — *C.R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, pp. 719-721.
17. D. RAQUET et A. KERLEVEO : Dosage des chlorures dans le lait. — *Ann. des fals.*, 1927, **20**, p. 580.
18. WUNSCHENDORFF : Fixation intégrale des protéines par les hydrates de métaux trivalents. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, pp. 184-198.
19. M. DOYON, GAUTIER et POLICARD : Action du chloroforme sur l'excrétion urinaire de l'urobiline. — *C.R. Soc. Biol.*, 1908, **70**, p. 574.
20. M. DOYON et GAUTIER : Comparaison de l'action du chloroforme et de l'éther sur la sécrétion urinaire de l'urobiline. — *C.R. Soc. Biol.* 1909, **71**, p. 616.
21. G.-H. ROGER : Traité de physiologie normale et pathologique. Tome III : Foie et Appareil urinaire (Masson, édit.).
22. P. CARRIE : L'urobiline; recherches cliniques et expérimentales. — *Thèse Méd.*, Paris, 1914.
23. M.-B. GOUZON : Production d'urobiline par action des rayons ultra-violetes sur la chlorophylle et les porphyrines. — *C.R. Ac. Sc.*, 1933, **196**, p. 1542.
24. Ch. DHERE et J. ROCHE : Recherches sur la florescence des pigments du groupe de l'urobiline. Détermination de leur spectre de fluorescence. *Bull. Soc. chim. biol.*, 1931, **13**, p. 987.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	9
CHAPITRE PREMIER. — <i>Généralités :</i>	
1) Quelques données chimiques sur l'urobiline	13
2) Exposé de quelques méthodes de dosage..	17
a) Dosage par mesure de la fluorescence....	17
b) Dosage de l'urobiline sous forme d'urobilinogène	19
CHAPITRE II. — <i>Exposé des travaux de Terwen sur l'urobiline :</i>	
1) Dosage de l'urobiline	23
a) Réactifs	23
b) Technique	25
c) Remarques	28
d) Détermination de la valeur des unités..	29
2) Préparation de l'urobiline à partir des matières fécales, par la méthode de Terwen.	30
3) Recherches de Terwen sur les diverses phases du dosage de l'urobiline dans l'urine.	32
CHAPITRE III. — <i>Etude et critique du dosage de Terwen :</i>	
1) Etude et comparaison des appareils de mesure.	37
a) Essais au colorimètre	38
b) Essais au photomètre	40
c) Etalonnage du photomètre par rapport aux unités Terwen	44
2) Dosage de l'urobilinogène préformé	46
3) Dosages totaux	47
a) Essais effectués avec des mélanges ou avec des dilutions d'urines	47
b) Essais effectués avec des solutions aqueuses de pigment	48

4) Influence du temps d'action du mélange réducteur	50
5) Valeur moyenne de l'erreur sur plusieurs dosages dans la même urine	52
6) Cas particuliers et remarques	53
a) Urines albumineuses	53
b) Urines contenant de la novocaïne	55
c) Urines contenant de l'indol	55
CHAPITRE IV. — <i>Essais de préparation de l'urobiline :</i>	
1) Essai d'extraction de l'urobiline des matières fécales	59
2) Essai d'extraction de l'urobiline urinaire..	61
a) Précipitation au sulfate d'ammoniaque..	61
b) Extraction chloroformique	62
3) Destruction de l'urobiline en solution dans le phosphate de soude.....	62
CHAPITRE V. — <i>Applications cliniques :</i>	
1) Action des anesthésiques sur l'urobilinurie (Chloroforme, éther, chlorure d'éthyle, mélange de Schleich, protoxyde d'azote, novocaïne)	66
2) Les ictères	69
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.....	73
BIBLIOGRAPHIE	75

